

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie
und -Toxikologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med. Helmut Kewitz

STABILITÄT UND ABBAU VON
TRYPTOPHANPYRROLASE UND
GLUCOSE-6-PHOSPHAT-
DEHYDROGENASE IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Raack

Tierarzt
aus Senftenberg

Berlin 1967

Journal-Nr. 598

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie
und -Toxikologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med. Helmut Kewitz

STABILITÄT UND ABBAU VON
TRYPTOPHANPYRROLASE UND
GLUCOSE-6-PHOSPHAT-
DEHYDROGENASE IN VITRO

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Raack

Tierarzt
aus Senftenberg

Berlin 1967

Journal-Nr. 598

Gedruckt mit Genehmigung der
Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Professor Dr. G. Bergmann

Referent: Professor Dr. H. Kewitz

Korreferent: Professor Dr. Dr. K. Drepper

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 1967



Druck: H. Franzen, Berlin 39 23 25

<u>Inhaltsverzeichnis</u> :	<u>Seite</u>
Einleitung	5
Material und Methoden	11
a) Versuchstiere	11
b) Adrenalektomie	11
c) Substanzen zur Anreicherung von Tryptophan- pyrrolase in vivo (Enzyminduktion)	11
d) Applikationsart	11
e) Substanzen, die zur Bestimmung der Tryptophan- pyrrolase dienten	12
f) Substanzen und Lösungen zur Bestimmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	12
g) Sonstige Substanzen und Lösungen	12
h) Gewinnung der Enzym-Präparate und Fraktio- nierung des Gewebes	13
i) Bestimmung der Tryptophanpyrrolase	15
k) Bestimmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	16
1. Prinzip der Methode	16
2. Durchführung der Messung	17
Ergebnisse	18
I. Versuche zur Aktivierung der Tryptophanpyrrolase	19
a) Vorinkubation mit verschiedenen Zusätzen	19
b) Temperaturabhängigkeit der Aktivierung	20
c) Abhängigkeit der Aktivität von der Enzym- konzentration	22
d) Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Zellpartikel in Verbindung mit MetHb oder Hämatin	23
e) Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Zellpartikel und Ascorbinsäure in Verbindung mit MetHb und Hämatin	31

	<u>Seite</u>
f) Feststellung der optimalen Konzentrationen von MetHb und Hämatin in Verbindung mit Ascorbinsäure und Zellpartikeln	36
g) Verlauf der enzymatischen Reaktion	36
II. Stabilität von Tryptophanpyrrolase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	37
a) Spontane Inaktivierung	37
b) Einfluß antibakterieller Stoffe auf die Inaktivierung	39
c) Bedeutung von Metallionen für die Inaktivierung	43
d) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Inaktivierung	43
e) Einfluß eines Proteinase-Hemmstoffes auf die Inaktivierung	46
f) Einfluß von Zellpartikeln auf die Inaktivierung im partikelfreien Cytoplasma	46
Besprechung der Ergebnisse	51
Zusammenfassung	57
Literaturverzeichnis	59

Einleitung :

Für das Studium pharmakologischer Wirkungen auf den Enzymstoffwechsel eignen sich besonders die Fermente, die rasch umgesetzt werden. Dazu gehört auch die Tryptophanpyrrolase, bei der Eingriffe in die Synthese oder in den Abbau am lebenden Tier schon nach kurzer Zeit, d.h. im Laufe einiger Stunden, zu Veränderungen der Enzymkonzentration führen.

Da Tryptophan der Ausgangsstoff ist für die Biosynthese der beiden bedeutsamen Wirkstoffe 5-Hydroxy-tryptamin und Nicotinsäureamid, ergeben sich aus einer veränderten Aktivität der Tryptophanpyrrolase wichtige Konsequenzen. - Außerdem sind in den letzten Jahren Befunde erhoben worden, die den Verdacht aufkommen ließen, daß primäre oder sekundäre Produkte der fermentativen Oxydation von Tryptophan bei der Entstehung von Blasenkrebs eine Rolle spielen könnten (1, 2, 3, 4, 34).

Ein weiterer Vorteil für experimentelle Arbeiten an diesem Enzym ist die relativ einfache Bestimmung der Enzymkonzentration. Das aus Tryptophan über das Zwischenprodukt Formylkynurenin entstehende Kynurenin absorbiert nämlich stark das Licht bei der Wellenlänge 360 nm, so daß die quantitative Bestimmung photometrisch erfolgen kann. Durch die Reaktion, die von der Tryptophanpyrrolase katalysiert wird, entsteht in Anwesenheit von Sauerstoff aus dem Tryptophan zunächst N-Formylkynurenin, das mit Hilfe von Kynurenin-Formidase zu Kynurenin und Ameisensäure umgesetzt wird. Beide Enzyme kommen in erster Linie in der Leber vor und befinden sich gelöst im Cytoplasma der Zellen, sind also nicht an Partikel oder Membranen gebunden. Da die Kynurenin-Formidase immer im Überschuß vorhanden ist, wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Menge an Tryptophanpyrrolase limitiert (28).

Tryptophanpyrrolase ist ein zusammengesetztes Enzym, das einen niedermolekularen Cofaktor benötigt. Als Coenzym sind verschiedene Derivate von Eisenprotoporphyrinen wirksam,

z.B. Hämatin, Hämoglobin oder Derivate, die sowohl in den Mitochondrien der Zellen, als auch in denjenigen Membranen des cytoplasmatischen Retikulums enthalten sind, die sich als Mikrosomen auf der Ultrazentrifuge abtrennen lassen (10).

Gewöhnlich ist nur ein Teil des in der Leber vorhandenen Apoenzyms mit Coenzym gesättigt (10). Aus diesem Grunde wird die Enzymaktivität durch Zugabe von Stoffen, die als Coenzym dienen können, zum Homogenat oder zum partikelfreien Cytoplasma erhöht.

Nach den Angaben von Tanaka und Knox ist das Enzym nur dann aktiv, wenn das Eisenion des Protoporphyrins in zweiwertiger Form vorliegt (44). Kaliumcyanid, das mit dreiwertigem Eisen reagiert, ist nicht imstande, Tryptophanpyrrolase zu hemmen. Durch Kaliumferricyanid dagegen, das zweiwertiges Eisen oxydiert, wird das Enzym inaktiviert. Durch Reduktion konnte diese Hemmung jedoch wieder aufgehoben werden. Zur Reduktion des Cofaktors eignet sich Ascorbinsäure oder ein Wasserstoff-superoxyd lieferndes System aus Glucose und Glucose-oxydase in Anwesenheit von Tryptophan. Durch spektrophotometrische Untersuchungen konnten Tanaka und Knox zeigen, daß sich in einer gereinigten Enzympräparation aus Pseudomonas-Bakterien bei Zusatz eines Reduktionsmittels in Anwesenheit von Tryptophan aus dem Fe^{+++} -Porphyrin-Enzym das Fe^{++} -Porphyrin-Enzym bildet (44).

Bei Untersuchungen des Stoffwechsels der Tryptophanpyrrolase müssen also die drei Formen, in denen das Enzym in vivo vorliegen kann, berücksichtigt werden:

- 1.) Das Holoenzym, das ohne den Zusatz von Coenzym direkt gemessen werden kann, 2.) die oxydierte Form des Holoenzym, die erst durch den Zusatz eines Reduktionsmittels und in Anwesenheit von L-Tryptophan aktiviert wird und 3.) das Apoenzym, das sich durch den Zusatz von Hämatin oder Hämoglobin gemeinsam mit Ascorbinsäure erfassen läßt oder auch durch die Zugabe von Zellpartikeln in aktives Holoenzym überführt wird.

Bei Abwesenheit von L-Tryptophan ist der Komplex aus Apoenzym und Coenzym relativ instabil und geht zum Teil schon während der Aufarbeitungszeit in inaktive Formen über. Ebenso läßt sich das Apoenzym vom Cofaktor durch Dialyse leicht trennen, wenn Tryptophan fehlt.

Deshalb wurden Verfahren vorgeschlagen, die zur Bildung eines ternären Komplexes zwischen Apoenzym, Coenzym und Substrat geeignet sind.

Knox, Piras und Tokuyama entwickelten dafür eine Methode, bei der durch Inkubation von konzentriertem, partikelfreiem Lebercytoplasma mit L-Tryptophan, Cofaktor und Ascorbinsäure das Enzym in eine Form überführt wird, in der es relativ stabil ist und bei der die in der Zelle vorliegenden inaktiven Vorstufen des Enzyms aktiviert werden (26, 22).

Greengard dagegen erreichte das gleiche Ziel durch den Zusatz von Cofaktor und Zellpartikeln zu verdünntem partikelfreiem Cytoplasma (20).

Gereinigtes Enzym erlangt sofort nach der Zugabe von Cofaktor seine volle Aktivität (25), während die Aktivierung im Homogenat 10 bis 15 Minuten in Anspruch nimmt und im partikelfreien Cytoplasma noch etwas länger dauert (22).

In vivo wird die Tryptophanpyrrolase durch einmalige Verabreichung von L-Tryptophan, D-Tryptophan oder α -Methyl-DL-Tryptophan, sowie durch Gabe von Glucocorticoiden innerhalb weniger Stunden, je nach Dosis, auf das 5-10fache gesteigert. Mit Hilfe immunologischer Verfahren konnte nachgewiesen werden, daß es sich dabei tatsächlich um eine Zunahme von Enzymprotein und nicht nur um eine Aktivierung handelt (13, 17).

Die Anreicherung des Enzymproteins durch L-Tryptophan (24) oder Analoge (43, 36, 35) läuft in 2 Phasen ab. In der ersten Phase verschwindet das Apoenzym, weil es in Holoenzym umgewandelt wird. Vermutlich bildet sich infolge der erhöhten Konzentration von freiem Tryptophan vermehrt ternärer Komplex aus Cofaktor, Apoenzym und Tryptophan, der

langsamer abgebaut wird, als das freie Apoenzym. Dann erst reichert sich das Enzym allmählich an, so daß schließlich vermehrt Enzymprotein in der Zelle vorliegt (13, 17).

Auch in vitro konnte nachgewiesen werden, daß die Stabilität des Enzyms durch Zusatz von L-Tryptophan, D-Tryptophan und α -Methyl-DL-Tryptophan erhöht wird. Zudem stellten Dubnoff und Dimick fest, daß das Enzym, das sich nach Gabe von Tryptophan anreichert, in vitro haltbarer ist als das nach Glucocorticoid-Gabe entstandene (9).

Diese Tatsachen führten zu der Annahme, daß die Erhöhung der Enzymkonzentration, die durch Tryptophan herbeigeführt wird, nicht auf einer gesteigerten Neubildung von Enzymprotein beruht, sondern auf einer Anhäufung von Enzym infolge verminderten Abbaus (18).

Untersuchungen mit Substanzen, die die Eiweißsynthese blockieren, gaben nähere Aufschlüsse darüber, Actinomycin D, das die Bildung von Messenger-Ribonucleinsäure hemmt, die bei der Eiweißsynthese eine entscheidende Rolle spielt, beeinflusste die Anreicherung des Enzyms nicht (19). Dagegen vermindert Puromycin, das den Einbau von Aminosäuren in die Peptidkette hemmt, auch die Vermehrung von Tryptophanpyrrolase nach Tryptophan-Gabe (32).

Einen weiteren Anhaltspunkt, der für den Mechanismus der Enzymvermehrung durch verminderten Abbau spricht, lieferten die Untersuchungen von Schimke, Sweeney und Berlin. Sie analysierten die experimentellen Befunde bei der Enzymanreicherung mathematisch: Eine Erhöhung der Konzentration durch Hemmung des Abbaus müßte zu einem linearen Anstieg der Konzentration führen. Diese theoretische Ableitung deckte sich mit dem experimentellen Befund (38, 39).

Dieselben Autoren fanden bei Untersuchungen über den Einbau von radioaktiv markiertem Leucin und Lysin in die Tryptophanpyrrolase keinen Hinweis auf eine gesteigerte Synthese, obwohl die immunologisch nachweisbare Menge an Tryptophanpyrrolase größer war (40).

Die Anreicherung der Tryptophanpyrrolase nach der Applikation von Glucocorticoiden wurde zuerst von Thomson und Mikuta beobachtet (45). Jedoch hatte Knox schon vorher eine Verminderung des Enzyms nach Adrenalektomie festgestellt (23).

Zunächst wurde vermutet, daß die Glucocorticoide auf Grund ihrer katabolen Wirkung die Tryptophan-Konzentration in den Zellen beeinflussen und infolgedessen sekundär auch die Aktivität der Tryptophanpyrrolase regulieren. Der den erwähnten Wirkungen zugrunde liegende Mechanismus, der zur Enzymvermehrung führt, wurde als gleichartig betrachtet. Eine Erhöhung der Konzentration des freien Tryptophans in der Leber ließ sich nach Verabreichung von Glucocorticoiden jedoch nicht nachweisen (5, 6).

Bei der Erhöhung der Enzymkonzentration auf diesem Wege kommt es nicht zu einer Sättigung des Apoenzyms durch Co-faktor, sondern das Verhältnis von Apoenzym zu Holoenzym bleibt das gleiche wie bei unbehandelten Ratten. - Im Gegensatz zur Anreicherung nach Tryptophan kann die durch Glucocorticoide hervorgerufene Vermehrung der Tryptophanpyrrolase durch Actinomycin D verhindert werden (19). Das deutet darauf hin, daß eine vermehrte Proteinbildung infolge gesteigerter Synthese von Messenger-RNS vorliegt.

Schimke, Sweeney und Berlin stellten fest, daß der Anstieg der Tryptophanpyrrolase nach Glucocorticoiden exponentiell erfolgt und nicht linear, wie nach Tryptophan.

Auch der Einbau der radiomarkierten Aminosäuren Leucin und Lysin in die Tryptophanpyrrolase war nach Hydrocortison auf das 6-7fache erhöht.

Die nachfolgend beschriebenen Experimente sollten einige Aufschlüsse über die Inaktivierung der Tryptophanpyrrolase liefern, weil darüber nur wenig Anhaltspunkte in der Literatur vorliegen. Sie sollten Auskunft geben über die reversible Inaktivierung und den irreversiblen Abbau unter ver-

schiedenen Bedingungen. Es sollte ermittelt werden, ob die verschiedenen Zellpartikel am Enzymabbau beteiligt sind.

Zum Vergleich wurde ein zweites im Zellplasma gelöstes Enzym, die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase herangezogen. Dieses Enzym katalysiert die Oxydation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phospho- δ -gluconolacton. Dabei wird Nicotinamid-Adenindinucleotid-phosphat (NADP) reduziert und es entsteht $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$.

Die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase wurde von Warburg und Christian entdeckt (48). Sie unterscheidet sich von der Tryptophanpyrrolase durch einen wesentlich langsameren Stoffwechsel. Die Halbwertszeit beträgt in Erythrocyten 60 Tage (30) gegenüber einer Halbwertszeit der Tryptophanpyrrolase in der Leber von 2 - 4 Stunden (33, 11).

Material und Methoden

a) Versuchstiere :

Die Untersuchungen wurden an 180-250 g schweren weiblichen Albino-Ratten durchgeführt, die zum überwiegenden Teil aus der Zucht der Firma Reupohl in Lage/Westf. (Firmenbezeichnung R 57), zum kleineren Teil aus der Zucht der Firma Hoffmann in Berlin (Wistar) stammten. - Die Tiere erhielten pelletiertes Alleinfutter der Firma Altrogge und Wasser ad libitum.

b) Adrenalektomie :

Die Operation erfolgte 5-6 Tage vor dem Versuch in Äthernarkose. Durch Haut und Fascien wurde ein 1-2 cm langer Schnitt beiderseits der Wirbelsäule in Nierenhöhe gelegt. Nach stumpfem Auseinanderdrängen der Muskelschicht konnten die extraperitoneal gelegenen Nebennieren vorgelagert und unter Kompression der versorgenden Gefäße mit einer gebogenen Pinzette samt der Kapsel entfernt werden. Der Wundverschluß erfolgte durch Anlegen von Michel-Klammern. - Zur Substitution erhielten die Ratten nach der Adrenalektomie als Tränke 0,9 %ige Kochsalz-Lösung.

c) Substanzen zur Anreicherung von Tryptophanpyrrolase in vivo (Enzyminduktion) :

DL-Tryptophan war in 0,9 %iger Kochsalz-Lösung unter Zusatz von 1 % Gummi arabicum suspendiert, Prednisolon-21-hemisuccinat-Na[®] ohne Zusatz von Gummi arabicum gelöst.

d) Applikationsart :

Beide Stoffe wurden intraperitoneal 4-5 Stunden vor dem Töten injiziert, weil die Anreicherung der Tryptophanpyrrolase nach dieser Zeit am stärksten ist. Die Tryptophan-

[®]Solu-Decortin-H der Firma Merck/Darmstadt

Dosis war in 4 ml Suspension enthalten und betrug 1 g/kg Körpergewicht.

Die Prednisolon-Dosis von 5 oder 10 mg/kg i.p. injiziert, befand sich gelöst in 0,5 ml.

Reagentien und Lösungen für in vitro-Versuche :

e) Substanzen, die zur Bestimmung der Tryptophanpyrrolase dienen:

e a) L-Tryptophan, chromatographisch rein.

e b) Häm, gelöst in $1,25 \times 10^{-2}$ n Kalilauge und dann 1 : 25 mit H_2O verdünnt. In der alkalischen Lösung entsteht Hämatin.

e c) Hämoglobin vom Rind, 2 x umkristallisiert, reinst. Die spektrometrische Analyse zeigte, daß der größte Teil in Form von Methämoglobin (MetHb) vorlag.

e d) Ascorbinsäure, p.a., neutralisiert durch eine äquimolare Menge Kaliumbicarbonat, p.a.

e e) DL-Kynurenin.

f) Substanzen und Lösungen zur Bestimmung der Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase:

f a) Triäthanolamin-Puffer-Lösung, pH 7,6 :

0,05 mol + Triäthanolamin

0,005 mol + Äthylendiamintetraacetat (EDTA)

0,024 mol + Salzsäure

ad 1000,0 aqua dest.

f b) Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat (NADP)

f c) Glucose-6-phosphat

g) Sonstige Substanzen und Lösungen :

g a) Kaliumphosphat-Puffer-Lösung, pH 7, 0,2 oder 0,02 molar

14 bzw. 1,4 Teile 1 mol/l sekundäres Kaliumphosphat

6 bzw. 0,6 Teile 1 mol/l primäres Kaliumphosphat

ad 100,0 ml 0,14 mol/l Kaliumchlorid-Lösung.

g b) Puffer-Lösung nach Krebs-Henseleit :

- 100 Teile 0,9 %ige Kochsalz-Lösung
- 4 Teile 1,15 %ige Kaliumchlorid-Lösung
- 3 Teile 0,11 mol/l Calciumchlorid-Lösung
- 21 Teile 1,3 %ige Natriumhydrogencarbonat-Lösung
- 1 Teil 2,11 %ige Kaliumhydrogenphosphat-Lösung
- 1 Teil 3,8 %ige Magnesiumsulfat-Lösung

g c) Saccharose, reinst

g d) Glucose, reinst

g e) Natriumchlorid, p.a.

g f) Kaliumchlorid, p.a.

g g) Äthylendiamintetraacetat, p.a. = EDTA

g h) L(+)-Cysteinchlorid

g i) Natronlauge, p.a.

g k) Metaphosphorsäure, p.a.

g l) Dodecylsulfat-Na-salz, krist. reinst

g m) Merthiolat (Äthylmercuri-thiosalicylsäure-Na-salz)

g n) Penicillin-G-Natrium, 1 mg = 1620 I.E.

g o) Streptomycin-Pantothenat, 1,516 g = 1 g Base

g p) Trasylol[®]

g q) Nipagin M-Nipazol M[®]

h) Gewinnung der Enzym-Präparate und Fraktionierung des Gewebes :

Nach Betäubung der Tiere durch einen Nackenschlag, anschließender Dekapitation und gründlicher Ausblutung wurde die Leber sofort entnommen, mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung abgespült und anschließend im doppelten oder im 15-fachen Volumen 0,02 mol/l K-Phosphat-Puffer im Potter-Elvehjem-Glas-Homogenisator mit einem Teflon[®]-Stempel unter ständiger Kühlung homogenisiert. Dabei richtete sich

die Konzentration des Homogenates nach der jeweils vorgesehenen Aktivierungsmethode.

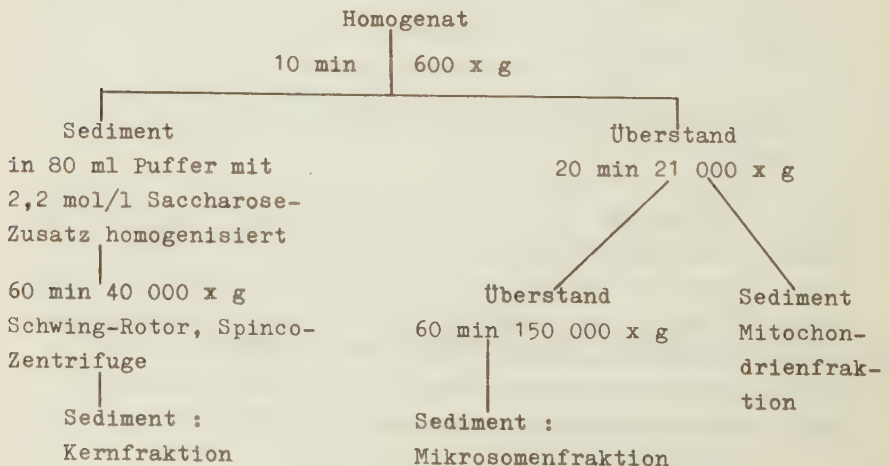
Im allgemeinen wurden Homogenate aus 2-6 Lebern hergestellt.

Durch Zentrifugieren bei 600 x g für 10 Minuten ließen sich die groben Bestandteile, wie Zellkerne und Blutkoagula, abtrennen. Aus dem Überstand konnten nach einstündigem Zentrifugieren bei 150 000 x g ein klarer Überstand von Partikeln freier gewonnen werden, in dem sich die beiden zu untersuchenden Fermente befanden. Bis zur weiteren Verwendung wurde er bei -20°C aufbewahrt. Das Verhältnis von Gewebsflüssigkeit zu Puffer betrug 1 : 3 bzw. 1 : 15.

Die Gewinnung der einzelnen Zellpartikel-Fractionen erfolgte entweder in Anlehnung an das Verfahren von Schneider (42) oder nach der Methode, die Greengard, Mendelsohn und Acs beschrieben haben (20).

h a) Verfahren nach Schneider :

Die durch Zentrifugation abgetrennten Partikelfractionen wurden vereinigt, mit 0,02 mol/l K-Phosphat-Puffer-Lösung, die 0,25 mol/l Saccharose enthielt, auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, homogenisiert und erneut nach folgendem Schema zentrifugiert :



Die Partikelfractionen wurden mit 0,02 mol/l K-Phosphat-Puffer auf das ursprüngliche Volumen des Homogenates aufgefüllt und homogenisiert. - In einigen Versuchen wurden auch andere Konzentrationen verwendet.

Die Partikelmenge wurde in Äquivalenten ausgedrückt. Ein Äquivalent ist die Menge, die in dem gleichen Volumen des Ausgangshomogenates vorhanden war.

Das in einigen Fällen vorgenommene fünfmalige Einfrieren und Auftauen sollte die Sprengung der Partikelmembranen bewirken.

h b) Verfahren nach Greengard, Mendelsohn und Acs :

Bei der Gewinnung der Partikel, wie Greengard sie beschrieben hat, wurde dem Puffer keine Saccharose zugesetzt. Die Trennung der Partikelfractionen erfolgte durch Zentrifugieren :

nach 10 min bei 600 x g setzten sich die Kerne ab,

nach 20 min bei 20 000 x g die Mitochondrien und

nach 60 min bei 100 000 x g die Mikrosomen.

i) Bestimmung der Tryptophanpyrrolase :

Das Verfahren ist von Knox und Mehler entwickelt worden (24). Das Produkt der Reaktion, die durch Tryptophanpyrrolase katalysiert wird, ist das N'-Formylkynurenin, das sehr rasch durch die im Cytoplasma der Leberzellen stets im Überschuß vorhandene Kynurenin-Formidase zu Kynurenin umgewandelt wird. Die Menge des entstandenen Kynurenins kann mit Hilfe der Ultraviolettabsorption im Maximum des Kynureninspektrums bei 360 nm gemessen werden.

Die Extinktion steigt nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz proportional zur Konzentration von Kynurenin an, so daß diese nach

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \quad \text{berechnet werden kann.}$$

E = Extinktion

ϵ = 4530 (molarer Extinktionskoeffizient des Kynurenins
bei 360 nm)

c = Konzentration des Kynurenins

d = Schichtdicke

Die Tryptophanpyrrolase-Aktivität wird ausgedrückt durch die Kynurenin-Menge, die pro Gramm Leberfrischgewicht innerhalb einer Stunde gebildet wird ($1 \mu\text{mol/g/h}$).

Die optimale Substratkonzentration beträgt $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$. Mit dieser Methode, ohne Zusatz von Stoffen mit Coenzym-Wirkung, wird nur das Holoenzym erfaßt, das in der Lösung vorliegt.

Durch Zusatz von Hämatin oder Methämoglobin kann auch das vorhandene Apoenzym zum Holoenzym ergänzt und damit die Summe aus Holo- und Apoenzym gemessen werden. Die Erprobung der optimalen Konzentrationen von Hämatin und Methämoglobin, sowie der zusätzliche Effekt, der durch Zugabe von Ascorbinsäure oder von Zellorganellen, z.B. Mitochondrien oder Mikrosomen erreicht werden kann, ist Teil der nachfolgend geschilderten Experimente.

Die Messung des entstandenen Kynurenins erfolgte im Spektrophotometer von Beckmann, Modell DB, oder im Spektralphotometer von Leitz Unicam SP 800.

k) Bestimmung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase :

1. Prinzip der Methode :

Bei der Reaktion, die durch G-6-P-DH katalysiert wird, entsteht pro Mol umgesetzten Glucose-6-phosphates ein Mol $\text{NADPH} + \text{H}^+$. In der reduzierten Form weist das NADP-Spektrum ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm auf, das beim oxydierten NADP nicht vorhanden ist. Infolgedessen läßt sich aus der Extinktionszunahme bei 340 nm errechnen, wieviel Substrat umgesetzt wurde.

2. Durchführung der Messung :

Die Messung der G-6-P-DH-Aktivität basierte auf den Angaben von Kornberg und Horecker (29). Der Untersuchungs-Ansatz bestand aus :

1. 0,1 ml der zu testenden enzymhaltigen Lösung, das heißt Überstand der einstündigen Zentrifugation bei 150 000 x g. Da sich G-6-P-DH, ebenso wie Tryptophanpyrrolase, im Cytoplasma der Leberzellen befindet, wurden beide Enzyme in den gleichen Gewebspräparationen bestimmt. Zur Messung der G-6-P-DH mußte soweit verdünnt werden, daß bei 340 nm eine Extinktionserhöhung von etwa 0,05/min eintrat.

2. 3 ml 0,05 mol/l Triäthanolamin-Puffer

3. 0,1 ml 0,01 mol/l NADP

4. 0,05 ml 0,03 mol/l G-6-P-Lösung

Die Reaktion beginnt mit der Zugabe des Substrates, die aber erst 15 Minuten nach dem Einpipettieren des NADP erfolgte, damit andere enzymatische oder nichtenzymatische Prozesse, durch die NADP reduziert wird, schon vor dem Zusatz des Substrates abgelaufen sind und die Messung nicht mehr beeinträchtigen können.

Die Extinktionsänderung bei 340 nm wurde mit einem Zeiss-Spektralphotometer, PMQ II, durch 6 Ablesungen in Abständen von 1 Minute verfolgt.

Ergebnisse :

Nur ein Teil der in der Zelle enthaltenen Tryptophanpyrrolase ist mit Cofaktor gesättigt und aktiv. Ein anderer, gewöhnlich der etwas größere Teil, liegt als inaktives Apoenzym vor. Deshalb läßt sich die meßbare Aktivität durch Zugabe von Hämatin oder Methämoglobin erhöhen.

Außerdem ist aber durch die Untersuchungen von Dubnoff und Dimick (9) und Civen und Knox (7) bekannt, daß Tryptophanpyrrolase in vitro relativ rasch seine Wirksamkeit verliert, wenn sie in einer Lösung aufbewahrt wird, die zu wenig oder kein Tryptophan enthält. Das Substrat stabilisiert also das Enzym, das seinen Abbau katalysiert. Wahrscheinlich bildet sich ein ternärer Komplex zwischen Apoenzym, Coenzym und Substrat. In diesem Komplex ist das Enzym gegen Inaktivierung geschützt.

Die Bildung des Komplexes im partikelfreien Cytoplasma geht, je nach der Temperatur, im Laufe von 20 - 60 Minuten, d.h. relativ langsam, vor sich. Folglich wird es sich vermutlich nicht um eine Assoziation oder Dissoziation der 3 Komponenten handeln, die als Gleichgewichtsreaktion aufzufassen wäre, sondern es müßte eher angenommen werden, daß eine relativ feste chemische Bindung entsteht. Aktives Enzym entsteht nur, wenn das Eisenion des Cofaktors in 2wertiger Form vorliegt.

Darüber hinaus wurde in letzter Zeit durch die Untersuchungen von Greengard, Mendelsohn und Acs die Frage aufgeworfen, ob das Enzym außerdem noch in einer nicht näher charakterisierten, aber inaktiven Form vorliegt, aus der es durch die Einwirkung von Bestandteilen der Zellorganellen in eine katalytisch wirksame Stufe überführt werden kann.

Da Untersuchungen über die Inaktivierung oder den Abbau des Enzyms die verschiedenen Zustandsformen zu berücksichtigen haben, in denen das Enzym vorliegt, mußte zunächst geklärt werden, auf welche Weise sich das Enzym in seinen verschiedenen Zustandsformen bestimmen läßt.

I. Versuche zur Aktivierung der Tryptophanpyrrolase.

Nach den Angaben von Knox, Piras und Tokuyama ist es mit der von ihnen entwickelten Methode, die auf dem Untersuchungsverfahren von Knox und Mehler basiert, möglich, die inaktiven Vorstufen in aktive Tryptophanpyrrolase umzuwandeln (22).

In einem Endvolumen von 2 ml werden

1 ml des enzymhaltigen Überstandes (Cytoplasma : Puffer =
1 : 3)

$2,5 \times 10^{-3}$ mol/l L-Tryptophan

5×10^{-4} g/ml MetHb

3×10^{-2} mol/l Ascorbinsäure

5×10^{-3} mol/l Phosphat-Puffer

in einem Wasserbad von 37°C 30 - 60 Minuten inkubiert. Diese Vorinkubation, die der Messung der Enzymaktivität vorausgeht, führt zur Aktivierung der inaktiven Vorstufen des Enzyms.

Daran schließt sich die Messung der Enzymaktivität an.

Der zur Messung bestimmte Ansatz enthält in 3 ml :

0,125 - 0,25 ml der Enzymverdünnung

5×10^{-2} mol/l Phosphat-Puffer, pH 7

$1,3 \times 10^{-6}$ mol/l Hämatin

10^{-2} mol/l neutralisierte Ascorbinsäure.

Gestartet wird die Reaktion nach vorheriger Erwärmung des Ansatzes auf 37°C durch den Zusatz des Substrates, das in 0,2 ml so dosiert wird, daß die Endkonzentration $3,3 \times 10^{-3}$ mol/l beträgt. Der Anstieg der Kynureninkonzentration wird fortlaufend, ohne Unterbrechung der Reaktion, im Spektrophotometer gemessen.

a) Vorinkubation mit verschiedenen Zusätzen.

Zunächst wurde geprüft, durch welche Zusätze zum Inkubationsmedium eine maximale Aktivierung zu erreichen ist.

Je ein frisch hergestellter Überstand, aus den Lebern von Ratten, die Prednisolon oder Tryptophan erhalten hatten,

wurde einzeln

1. ohne Zusätze
2. mit 5×10^{-4} g/ml MetHb
3. mit $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l Tryptophan
4. mit $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l Tryptophan + 5×10^{-4} g/ml MetHb
5. mit $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l Tryptophan + 5×10^{-4} g/ml MetHb +
 3×10^{-2} mol/l Ascorbinsäure

bis zu 3 Stunden inkubiert (Abb. 1 a + b).

Zu den in Abb.1a + b angegebenen Zeitpunkten wurden Proben zur Messung der Enzymaktivität entnommen. Dabei zeigte sich, daß durch den Zusatz von Tryptophan + MetHb während der Inkubation die höchste Enzymaktivität erreicht wurde. Der Zusatz von Ascorbinsäure bewirkte darüber hinaus keine Steigerung.

Diese höchste Aktivität war manchmal schon nach 30 Minuten, auf jeden Fall aber nach 60 Minuten erreicht. Deshalb wurde in den nachfolgenden Untersuchungen die Zeit von 60 Minuten eingehalten.

In dem Überstand, der von Lebern Prednisolon behandelte Tiere stammte, bewirkte die Vorinkubation eine Steigerung der Enzymaktivität auf das 3fache, in dem von Lebern Tryptophan behandelte auf das 1,5fache.

Die Tatsache, daß die Ascorbinsäure in diesem Fall keinen aktivitätssteigernden Effekt hatte, stimmt mit den Angaben von Knox überein, der den Effekt der Ascorbinsäure vor allem bei gealterten Enzympräparationen beobachtete (27).

b) Temperaturabhängigkeit der Aktivierung.

Die Durchführung der Aktivierung mit L-Tryptophan und MetHb erbrachte nach 1 Stunde bei 27°C nur 70 % der Aktivität, die unter sonst gleichen Bedingungen bei 37°C zu erreichen war (Abb.2).

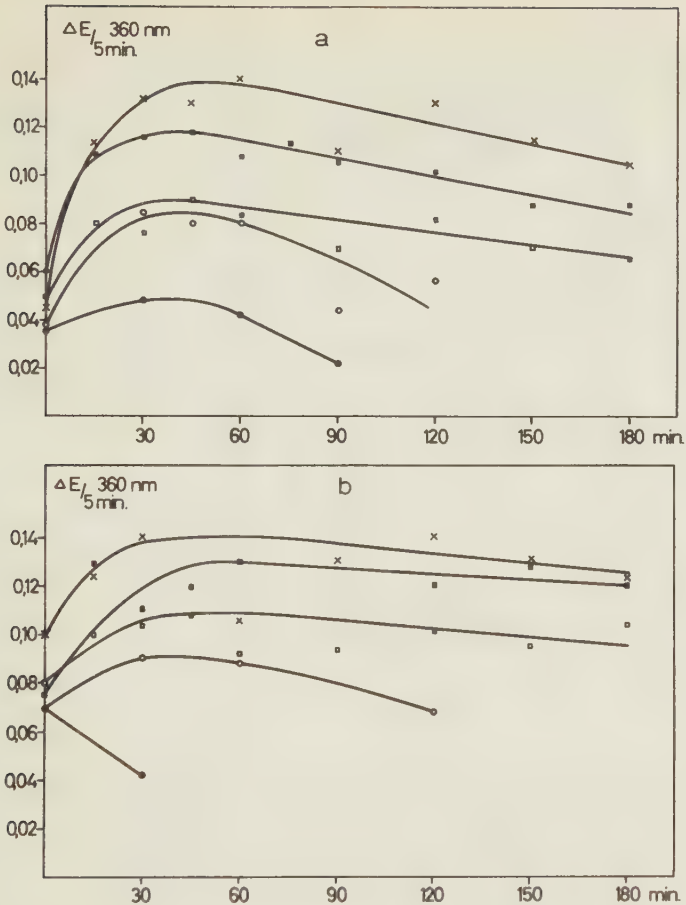


Abb. 1 a + b :

Aktivierung der Tryptophanpyrrolase aus der Leber von Tieren, die 4 Stunden vor dem Töten

a) 10 mg Prednisolon /kg Körpergewicht

b) 1 g DL-Tryptophan /kg Körpergewicht erhalten hatten.

Abhängigkeit der Aktivierung von verschiedenen Zusätzen zum Medium während der Aktivierungsperiode in vitro :

1. keine Zusätze

2. 5×10^{-4} g/ml MetHb

3. $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l Tryptophan

4. 5×10^{-4} g/ml MetHb + $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l Tryptophan

5. 5×10^{-4} g/ml MetHb + $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l Tryptophan + 3×10^{-2} mol/l Ascorbinsäure

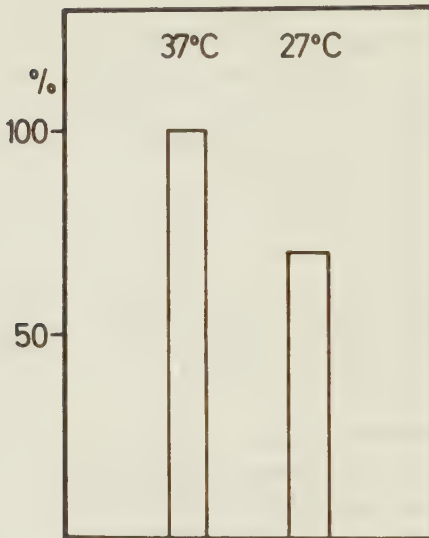


Abb. 2 :

Aktivierung von Tryptophanpyrrolase aus Lebern von Ratten, die 5 Stunden vorher 10 mg Prednisolon /kg Körpergewicht erhalten hatten.

Das Inkubationsmedium enthielt folgende Zusätze:

$2,5 \times 10^{-3}$ mol/l L-Tryptophan

5×10^{-4} g/ml MetHb

3×10^{-2} mol/l Ascorbinsäure

Die Inkubation erfolgte bei 37°C

und 27°C

c) Abhängigkeit der Aktivität von der Enzymkonzentration.

Bei Einsatz steigender Mengen des aktivierten Enzyms, d.h. 0,125, 0,25 und 0,5 ml der Verdünnung ergab sich, daß nur

bis zu einer bestimmten Enzymkonzentration Proportionalität zwischen der Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit und der Enzymmenge vorhanden war. Diese Grenzkonzentration entsprach etwa der Enzymmenge, die notwendig ist, um in 3 ml Lösung pro Stunde $0,6 \mu\text{mol/l}$ L-Tryptophan in Kynurenin zu überführen (Abb.3).

Deshalb wurde in den nachfolgenden Untersuchungen darauf geachtet, daß diese Konzentration von 0,125 ml des 1:6 verdünnten partikelfreien Cytoplasmas pro 3 ml nicht überschritten wurde.

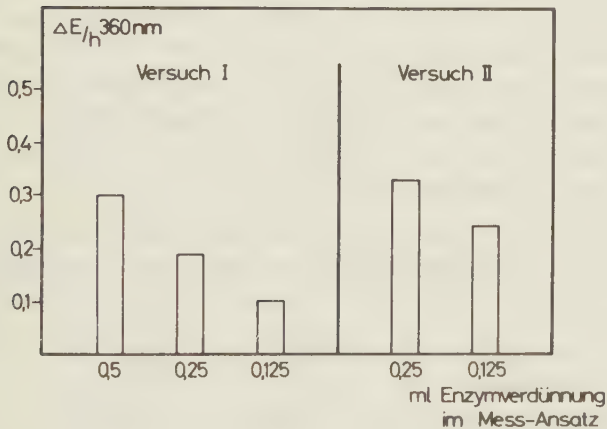


Abb. 3 :

Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 a.

Abhängigkeit der Tryptophanpyrrolase-Aktivität von der Enzymkonzentration.

d) Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Zellpartikel in Verbindung mit MetHb oder Hämatin.

Nach den Angaben von Greengard, Mendelsohn und Acs ist es

mit der von ihnen entwickelten Methode möglich, in einer stark verdünnten Enzympräparation, hergestellt aus den Lebern von Ratten, die Hydrocortison bekommen hatten, die Enzymaktivität durch Zusatz von Mikrosomen oder Mitochondrien und MetHb im gleichen Ausmaß zu steigern, wie mit der Knoxschen Methode (20).

In einem Gesamtvolumen von 24 ml 2×10^{-3} mol/l Phosphat-Puffer, pH 7 werden 3 ml des fermenthaltigen partikelfreien Cytoplasmas, das im Verhältnis 1:15 mit Phosphat-Puffer verdünnt ist, 3×10^{-3} mol/l MetHb oder 5×10^{-7} mol/l Hämatin, 0,5 Äquivalente Mikrosomen oder Mitochondrien, $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l Tryptophan bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Nach bestimmten Zeitintervallen werden Proben von 3 ml entnommen und in 1,5 ml 24 %ige Metaphosphorsäure gegeben, so daß die Reaktion sofort zum Stillstand kommt. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins und Neutralisation des klaren Überstandes mit 1,5 ml 1,5 n NaOH erfolgt die Messung der Extinktion bei 360 nm, aus der sich die Kynureninkonzentration errechnen läßt.

Die Bedingungen in den nachfolgenden Untersuchungen unterschieden sich in einigen Punkten von denen, die Greengard beschrieben hat :

1. Zur Behandlung der Ratten wurde Prednisolon statt Hydrocortison verwendet.
2. Die MetHb-Konzentration wurde von 3×10^{-6} mol/l auf 1×10^{-5} mol/l erhöht. Das entspricht der von Knox in seinen Versuchen verwendeten Konzentration.
3. Die Hämatin-Konzentration war von 5×10^{-7} mol/l auf 2×10^{-6} mol/l gesteigert worden. Diese Konzentration ist von Kewitz und Wagner als optimal für Leberhomogenate festgestellt worden (21).
4. Während der enzymatischen Oxydation des Tryptophans wurde die Lösung mit Sauerstoff durchperlt.

Die Enzymaktivität wurde in Überständen aus Lebern von Tieren, die Tryptophan erhalten hatten, ebenso wie von Tieren, die mit Prednisolon behandelt waren, untersucht. Dabei sollte verglichen werden, welche Effekte 1×10^{-6} mol/l MetHb, 2×10^{-6} mol/l Hämatin, 0,5 Äquivalente Mikrosomen und 0,5 Äquivalente Mitochondrien hervorrufen (Abb.4). Wie Abb.4 zeigt, wird die Enzymaktivität durch Hämatin etwa um 50 % gesteigert. Eine etwa gleiche Erhöhung der Enzymaktivität trat bei Zusatz von Mikrosomen oder Mitochondrien ein. Dagegen erhöhte sich die Enzymaktivität durch MetHb ungefähr auf das dreifache. Über diese Zunahme hinaus konnte durch Zusatz von Mikrosomen oder Mitochondrien keine weitere Aktivierung erreicht werden, wie dies von Greengard beschrieben wurde.

Auch eine erhöhte Menge von Partikeln, z.B. 0,25 - 5 Äquivalente oder Zerstören der Partikelmembranen durch dreimaliges schnelles Einfrieren und Auftauen waren unwirksam. Partikel, die von Tieren stammten, die mit Tryptophan behandelt waren, statt mit Prednisolon, hatten keinen weiteren Effekt.

Diese Befunde ließen sich an partikelfreiem Cytoplasma von Tieren, die 4 Tage vor der Prednisolon-Behandlung adrenalektomiert worden waren, reproduzieren.

Da Greengard in der Beschreibung der Versuchsanordnung angegeben hatte, daß die Messung der Enzymaktivität im allgemeinen 70 Minuten nach dem Töten der Tiere erfolgte, wurde in einem Versuch diese Zeitspanne eingehalten. - Der Vergleich mit Überständen, die mehrere Stunden bei -20°C eingefroren waren, zeigte keinen Unterschied im Ausmaß der Aktivierung.

Auffallend war, daß in den angeführten Untersuchungen zwar kein aktivierender Effekt durch den Partikel-Zusatz erreicht werden konnte, daß jedoch durch MetHb allein eine Aktivitätssteigerung bewirkt wurde, die in der Größenordnung lag, die von Greengard mit Hilfe der Partikel erzielt worden waren.

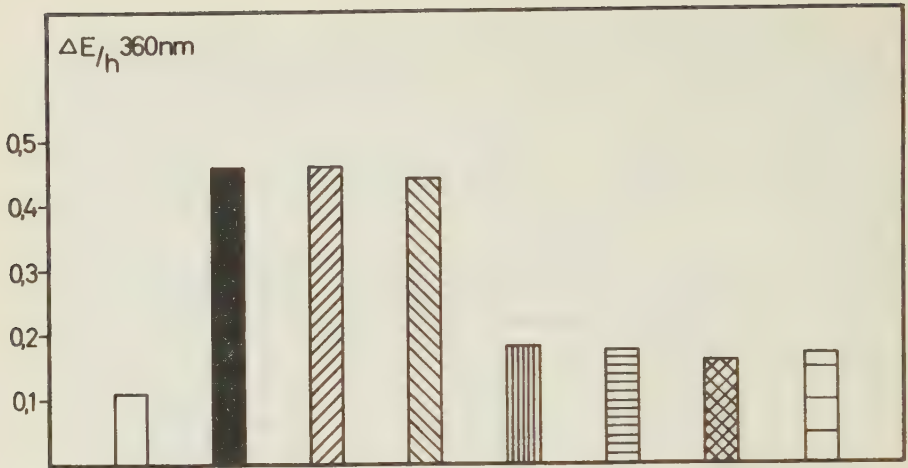


Abb. 4 :

Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 a.

Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch verschiedene Cofaktoren und Zellpartikel.

Bestimmung der Aktivität unter folgenden Zusätzen:

ohne Zusätze

10⁻⁵ mol/l MetHb

10⁻⁵ mol/l MetHb + 1 Äquivalent Mitochondrien

10⁻⁵ mol/l MetHb + 1 Äquivalent Mikrosomen

1 Äquivalent Mitochondrien

1 Äquivalent Mikrosomen

2 x 10⁻⁶ mol/l Hämatin

10 Äquivalente Mikrosomen



2×10^{-6} mol/l Hämatin ist im Homogenat genauso wirksam wie 1×10^{-5} mol/l MetHb, hat aber im Zellüberstand nur 30 % der Wirksamkeit. Jedoch war Hämatin zusammen mit 0,5 Äquivalenten Mikrosomen oder Mitochondrien im partikel-freien Überstand genauso wirksam wie 1×10^{-5} mol/l MetHb (Abb.5).

Das deutete darauf hin, daß der Hämatin-Zusatz allein nicht ausreichte, um das vorhandene Apoenzym völlig mit Cofaktor zu versorgen.

Aufgrund dieser Befunde war es naheliegend, zu überprüfen, ob die von Greengard angegebene MetHb-Konzentration von 3×10^{-6} mol/l ausreichte, um das Enzym voll zu aktivieren, oder ob der Effekt der Partikel nicht darauf beruhte, den nicht ausreichend vorhandenen Cofaktor zu ergänzen.

In Abb.6 u. 7 sind Versuche dargestellt, die der Ermittlung optimaler Konzentrationen der beiden verwendeten Cofaktoren MetHb und Hämatin dienen sollten. Dabei konnte 1×10^{-5} mol/l als wirksamste MetHb-Konzentration bestätigt werden. Die dadurch erreichte Steigerung der Enzymaktivität lag weit über der Wirkung, die durch die höchste Hämatin-Konzentration hervorgerufen wurde. Die optimale Hämatin-Konzentration betrug 2×10^{-5} mol/l. In beiden Fällen wurde eine Grenzkonzentration erreicht, oberhalb derer eine weitere Steigerung der Enzymaktivität nicht mehr möglich war.

Für die Wirksamkeit von MetHb ist der Proteinanteil von Bedeutung, da die Wirksamkeit im Gegensatz zu der von Hämatin durch Erhitzen im kochenden Wasserbad für 10 Minuten stark vermindert wird.

1×10^{-6} mol/l MetHb, eine Konzentration, die allein das Enzym nur etwa so stark aktiviert, wie 2×10^{-6} mol/l Hämatin, d.h. nur um etwa 50 %, steigerte in Verbindung mit 1 Äquivalent Mikrosomen die Enzymaktivität ebenfalls auf die volle Höhe (Abb.5).

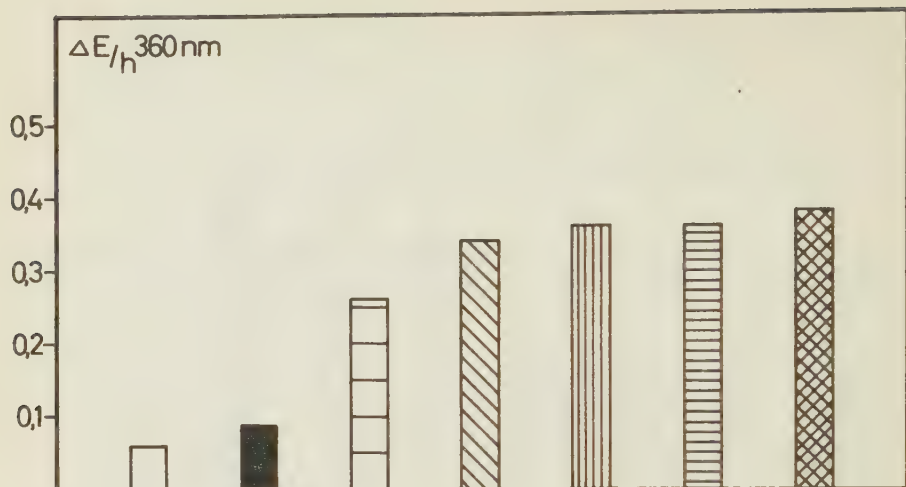


Abb. 5 : Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 a

Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Zellpartikel bei suboptimaler MetHb-Konzentration und bei Verwendung von Hämatin.

Bestimmung der Enzymaktivität unter folgenden Zusätzen :

1. ohne Zusätze



2. 10⁻⁵ mol/l MetHb



3. 10⁻⁶ mol/l MetHb + 0,5 Äquivalente Mikrosomen (vor dem Zusatz auf 100°C 10 Minuten erhitzt)



4. 10⁻⁶ mol/l MetHb + 0,5 Äquivalente Mikrosomen



5. 2 x 10⁻⁶ mol/l Hämatin + 0,5 Äquivalente Mitochondrien



6. 2 x 10⁻⁶ mol/l Hämatin + 0,5 Äquivalente Mikrosomen



7. 10⁻⁵ mol/l MetHb



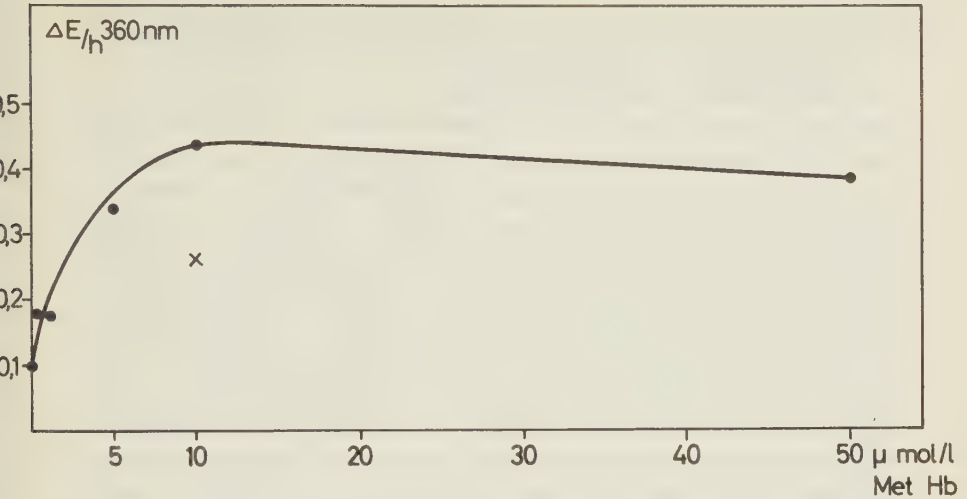


Abb. 6 : Vorbehandlung der Tiere wie bei 1 a

Abhängigkeit der Tryptophanpyrrolase-Aktivität von der MetHb-Konzentration.

X MetHb-Lösung vorher 10 Minuten auf 100°C erhitzt.

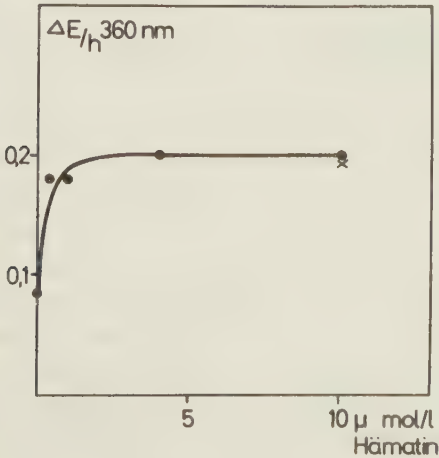


Abb. 7 : Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 a

Abhängigkeit der Tryptophanpyrrolase-Aktivität von der Hämatin-Konzentration.

X 10^{-5} mol/l Hämatin-Lösung vorher 10 Minuten auf 100°C erhitzt.

Das bedeutet, daß der von Greengard beschriebene Effekt der Zellorganellen auf die Tryptophanpyrrolase-Aktivität nur bei suboptimalen Coenzym-Konzentrationen demonstriert werden kann. Auch dieser Effekt verschwindet, wenn das Protein durch vorheriges Erhitzen der Partikel denaturiert wird. Hier findet sich also die gleiche Wirkung wie bei MetHb.

Durch den Zusatz von Partikeln allein, in Konzentrationen bis zu 10 Äquivalenten, konnte das Enzym höchstens bis zu 60 % aktiviert werden (Abb.4). Dabei war durch Inkubation der Partikel ohne Enzymzusatz sichergestellt worden, daß die Partikel selbst frei von meßbarer Enzymaktivität waren.

Diese Befunde sprechen dafür, daß der Partikel-Effekt, den Greengard und ihre Mitarbeiter beschrieben haben, zumindest teilweise auf einer Ergänzung des nicht in optimaler Konzentration vorliegenden Coenzym oder der Vermittlung einer besseren Bindung des Coenzym an das Apoenzym beruht.

Dem entspricht auch die Beobachtung von Greengard, daß die Partikel in einem Überstand, der aus den Lebern Tryptophan-behandelter Ratten hergestellt wurde, keinen aktivierenden, sondern nur einen gewissen stabilisierenden Effekt haben, da unter diesen Bedingungen das Apoenzym von vornherein weitgehend mit Coenzym gesättigt vorliegt (20).

Bei dem Vorgang der Aktivierung treten offenbar die Partikel einerseits und das Hämatin oder MetHb andererseits in eine Beziehung zueinander und zu dem Apoenzym, die durch einfache Addition der Einzeleffekte der jeweiligen Komponenten nicht zu erklären ist. Die Funktion der Partikel geht dabei über die einer quantitativen Ergänzung nicht optimaler Coenzym-Konzentrationen hinaus, wobei die Art des Cofaktors eine Rolle spielt, da mit der optimalen MetHb-Konzentration auch ohne die Partikel die volle Aktivität erreicht wird, mit optimalen Hämatin-Konzentrationen dagegen nicht.

e) Aktivierung der Tryptophanpyrrolase durch Zellpartikel und Ascorbinsäure in Verbindung mit MetHb und Hämatin.

In einem Überstand, der 8 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt worden war, konnte die Tryptophanpyrrolase nur in geringem Ausmaß durch 10^{-5} mol/l MetHb aktiviert werden. In diesem Fall war bei Zusatz von frischen Mikrosomen eine deutliche Aktivierung festzustellen (Abb.8) : In dem Überstand, der von Lebern Prednisolon-behandelter Ratten stammte, konnte eine Erhöhung auf das 8fache, in den von Lebern Tryptophan-behandelter auf das 3fache, bewirkt werden, gegenüber der Aktivität, die nur mit dem MetHb-Zusatz erzielt wurde. Dieser Effekt erinnerte an den von Knox und Mitarbeitern beschriebenen Vorgang der Aktivierung des gealterten oder einer Dialyse unterworfenen Enzyms durch Inkubation mit Tryptophan, MetHb und Ascorbinsäure (27).

In einem Versuch, in dem die Enzymaktivität in verschiedenen Medien

1. ohne Zusätze
2. mit 10^{-5} mol/l MetHb
3. mit 10^{-5} mol/l MetHb + 0,5 Äquivalenten Mikrosomen
4. mit 10^{-5} mol/l MetHb + 10^{-2} mol/l Ascorbinsäure

gemessen wurde, zeigte sich, daß durch den Ascorbinsäure-Zusatz etwa 30-40 % mehr Aktivität gemessen werden konnte als in den Ansätzen, die MetHb oder MetHb + Partikel enthielten (Abb.9).

Im folgenden wurde die Reaktivierung durch Partikel und Ascorbinsäure an einem Überstand, der mit und ohne Zusatz von 3×10^{-3} mol/l L-Tryptophan über längere Zeit im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurde, untersucht.

Um die Aktivierungsphase, d.h. den Zeitraum, der vergeht, bis das Enzym die maximale Aktivität erreicht hat, genauer bestimmen zu können, erfolgte die Messung fortlaufend im Spektrophotometer von Leitz-Unicam. Die Sauerstoff-Durchströmung entfiel dabei.

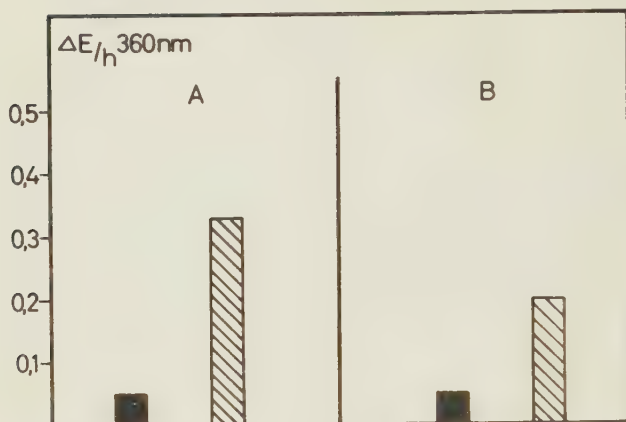


Abb. 8 :

Aktivierung von gealtertem Enzym (7 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt)

Tryptophanpyrrolase aus Lebern von Tieren, die 4 Stunden vorher A. 10 mg Prednisolon /kg Körpergewicht

B. 1 g DL-Tryptophan /kg Körpergewicht

erhalten hatten.

Aktivierung durch Zusatz von :

10^{-5} mol/l MethHb



10^{-5} mol/l MethHb + 1 Äquivalent Mikrosomen.



Die Bestimmung wurde in folgenden Ansätzen vorgenommen (Abb.10)

1. ohne Zusätze
2. mit 10^{-5} mol/l MethHb
3. mit 10^{-5} mol/l MethHb + 10^{-2} mol/l Ascorbinsäure

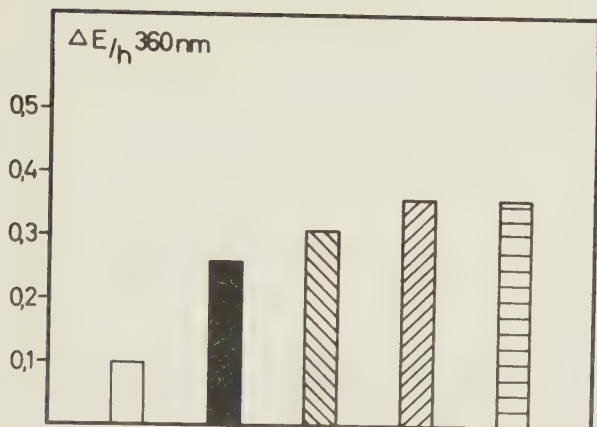


Abb. 9 : Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 a

Aktivierung von Tryptophanpyrrolase durch MetHb in Verbindung mit Zellpartikeln oder Ascorbinsäure.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte unter folgenden Zusätzen:

1. ohne Zusätze

2. 10⁻⁵ mol/l MetHb

3. 10⁻⁵ mol/l MetHb + 0,5 Äquivalente Mikrosomen

4. 10⁻⁵ mol/l MetHb + 0,5 Äquivalente Mitochondrien

5. 10⁻⁵ mol/l MetHb + 10⁻² mol/l Ascorbinsäure



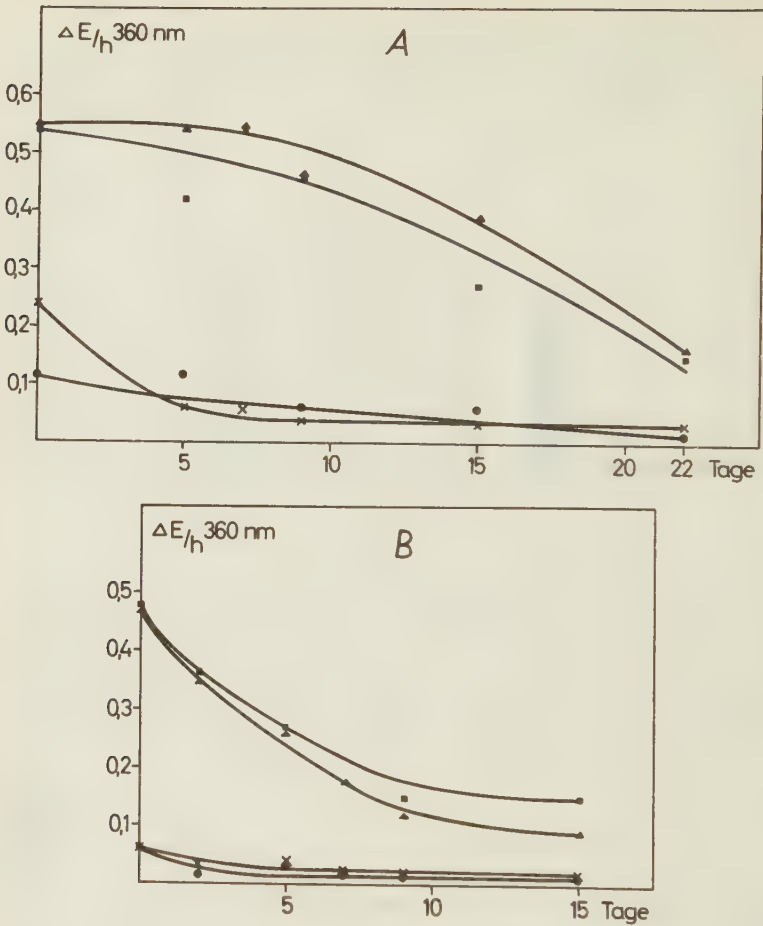


Abb. 10 : Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 a
Abnahme der Enzymaktivität im Laufe von 22 Tagen bei 4°C

A. mit Zusatz von L-Tryptophan zum Aufbewahrungsmedium
B. ohne Zusatz von L-Tryptophan zum Aufbewahrungsmedium

Bestimmung der Aktivität in folgenden Ansätzen:

1. keine Zusätze
2. 10^{-5} mol MetHb
3. 10^{-5} mol MetHb + 10^{-3} mol/l Ascorbinsäure
4. 10^{-5} mol MetHb + 10^{-3} mol/l Ascorbinsäure + 1 Äquivalent Mikrosomen



4. mit 10^{-5} mol/l MetHb + 10^{-2} mol/l Ascorbinsäure
+ 1 Äquivalent frische Mikrosomen.

In dem Ansatz, der mit L-Tryptophan-Zusatz aufbewahrt worden war, konnte am 5.Tag noch die gleiche Aktivität gemessen werden, wie am 1.Tag und auch danach nahm sie nur langsam ab. Das Enzym ist also in tryptophan-haltiger Lösung ziemlich stabil.

In der ohne L-Tryptophan-Zusatz aufbewahrten Enzympräparation war von Anfang an sehr wenig Holoenzym enthalten, so daß die Aktivität an der unteren Grenze der Meßbarkeit lag.

Durch MetHb allein ließ sich das Enzym in beiden Ansätzen nur zu Anfang und auch nicht vollständig aktivieren. Eine Aktivierung des gealterten Enzyms durch MetHb trat nicht ein. Daraus ergab sich, daß das Vermögen des Enzyms, MetHb zu binden, sowie das eigene Reduktionsvermögen der Enzympräparation sehr schnell verloren gegangen waren.

Durch MetHb und Ascorbinsäure (Ansatz 3) war noch nach 7 Tagen eine vollständige Aktivierung des Enzyms in dem Überstand möglich, der Tryptophan enthielt.

Bei Anwesenheit von Tryptophan waren also das Apoenzym und das Holoenzym sehr stabil.

Bei Aufbewahrung ohne Tryptophan-Zusatz nahm dagegen die Konzentration des Apoenzyms ziemlich gleichmäßig ab.

Der Partikel-Zusatz (Ansatz 4) bewirkte keine stärkere Aktivierung des Enzyms als die Ascorbinsäure allein. Jedoch wurde durch die Partikel die Zeit, die zur Aktivierung notwendig ist, um 40-50 % verkürzt.

Die Aktivierungsphase nahm mit zunehmender Alterung des Enzyms, bis zu 60 Minuten im Ansatz 3, zu. Erst nach deutlicher Verringerung der Konzentration des aktivierbaren Enzyms infolge der Alterung, ebenso durch Verdünnung, verkürzte sie sich wieder.

f) Feststellung der optimalen Konzentration von MetHb und Hämatin in Verbindung mit Ascorbinsäure und Zellpartikeln.

Im Verlauf der Versuche zur Aktivierung frischer oder gealterter Tryptophanpyrrolase, nachdem der positive Effekt der Ascorbinsäure festgestellt worden war, erfolgte die Bestimmung der optimalen Konzentration der Ascorbinsäure und der Partikel in Kombination mit MetHb und Hämatin.

Bei 10^{-5} mol/l MetHb und 10^{-5} mol Hämatin ergab sich eine optimale Ascorbinsäure-Konzentration von 10^{-3} mol/l.

Durch den Zusatz von Ascorbinsäure wurde die aktivierende Wirkung des Hämatins wesentlich weniger gesteigert, als die des MetHb.

Die Kombination der beiden Komponenten ermöglichte es, in den vorliegenden Versuchen eine höhere Gesamtaktivität zu messen, als mit der von Greengard beschriebenen Methode mit MetHb und Zellpartikeln. Besonders stark wirkte sich das bei Enzympräparationen aus, die einige Tage im Kühlschrank gestanden und dadurch Aktivität verloren hatten.

Der Zusatz von Partikeln und Ascorbinsäure hatte den Vorteil, daß die Aktivierungsphase verkürzt wurde.

g) Verlauf der enzymatischen Reaktion.

Bei der Messung der Enzymaktivität verminderte sich die Reaktionsgeschwindigkeit nach einiger Zeit, so daß der anfangs lineare Extinktionsanstieg flacher wurde. Bei hoher Aktivität war die lineare Phase kürzer als bei niedriger Aktivität. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit war nicht durch Substratmangel bedingt, denn durch erneute Zugabe von Substrat, Partikeln oder Ascorbinsäure war keine Beschleunigung zu erreichen.

Auch eine Hemmung durch das Endprodukt der Reaktion konnte ausgeschlossen werden, weil der Zusatz von $1,25 - 2,5 \times 10^{-4}$ mol/l DL-Kynurenin den Reaktionsablauf nicht beeinflusste.

II. Stabilität von Tryptophanpyrrolase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase.

Die vorangehend geschilderten Versuche haben gezeigt, daß im partikelfreien Cytoplasma der Leber außer dem Holoenzym und dem Apoenzym noch eine Vorstufe der Tryptophanpyrrolase enthalten ist, die durch die Zugabe von Coenzym gemeinsam mit Ascorbinsäure und Tryptophan im Laufe von 30 bis 60 Minuten bei 37° in wirksames Holoenzym überführt wird. In den folgenden Experimenten wurde deshalb die Fraktion, die aus präformiertem Apoenzym und Holoenzym besteht, von der gesamten Enzymaktivität differenziert, die erst nach vorheriger Inkubation mit den erwähnten Substanzen gemessen werden kann. So wird die "Apo- und Holoaktivität" von der "Gesamtaktivität" unterschieden.

a) Spontane Inaktivierung :

Die Untersuchungen sollten zeigen, ob Tryptophanpyrrolase durch bestimmte Zellbestandteile in vitro abgebaut oder inaktiviert wird. Dazu war es erforderlich, zunächst die Stabilität des Enzyms im partikelfreien Cytoplasma zu prüfen und festzustellen, ob das durch vorherige Behandlung der Tiere mit Prednisolon angereicherte Enzym eine andere Haltbarkeit aufweist als das durch Tryptophan angereicherte. Abb.11 zeigt den stark von der Temperatur abhängigen Verlust der Gesamtaktivität im Laufe von einigen Stunden. Bei 37°C werden in 2 Stunden etwa 90 % inaktiviert, bei 27° dagegen nur 40 %. Erst nach 8 Stunden waren 90 % der Aktivität verlorengegangen. Dagegen ist die Gesamtaktivität des durch Tryptophan angereicherten Enzyms wesentlich stabiler. Die Inaktivierung von 90 % erforderte bei 37°C 4 Stunden, also doppelt so lange, wie in dem Cytoplasma, in dem die Tryptophanpyrrolase durch vorherige Prednisolonbehandlung der Tiere angereichert worden war. Bei 27°C trat die Verzögerung noch deutlicher hervor, denn die Inaktivierung benötigte ca 3 mal soviel Zeit. Entweder handelt es

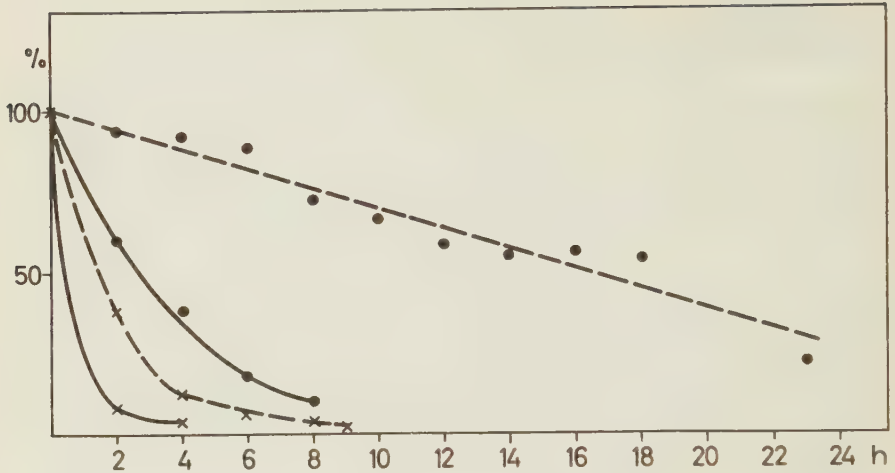


Abb. 11 : Stabilität von Tryptophanpyrrolase im partikelfreien Cytoplasma

bei 37°C

x

und bei 27°C

•

a) durch vorherige Behandlung mit
10 mg Prednisolon /kg Körpergewicht
angereicherte Tryptophanpyrrolase

—

b) durch vorherige Behandlung mit
1 g DL-Tryptophan /kg Körpergewicht
angereicherte Tryptophanpyrrolase.

Enzymaktivität gemessen in % der Ausgangsaktivität.

sich bei den durch Tryptophan oder Prednisolon angereicherten Enzymen um 2 verschieden stabile Formen des gleichen Enzyms oder die Vorbehandlung mit Tryptophan führt zur Steigerung der Konzentration von freiem Tryptophan oder von Folgeprodukten in den Zellen und die Stabilisierung wird dadurch bewirkt. Die Erhöhung der Tryptophankonzentration im Cytoplasma konnte tatsächlich schon früher nachgewiesen werden. Da auch der stabilisierende Effekt des Tryptophans

bereits bekannt ist, war es naheliegend, die Anreicherung der Tryptophanpyrrolase nach einer Tryptophaninjektion auf diesen Mechanismus zurückzuführen, das heißt auf eine Schutzwirkung des Tryptophans gegen die Inaktivierung des Enzyms in der Zelle. Die Anreicherung käme also nicht durch eine induzierte Mehrbildung zustande, sondern das Gleichgewicht wäre durch eine Verminderung des Abbaues verschoben.

Der stabilisierende Effekt des Tryptophans in vitro konnte bestätigt werden. Das geht aus Abb.12 hervor, die außerdem zeigt, daß Prednisolon in der Konzentration von 5×10^{-5} mol/l die Inaktivierungsgeschwindigkeit nicht verändert. Auch mehrere andere Konzentrationen im Bereich von $1,5 \times 10^{-6}$ mol/l bis $1,2 \times 10^{-4}$ mol/l waren völlig wirkungslos.

Um feststellen zu können, welche Effekte auf einer unspezifischen, allgemeinen Eiweißdenaturierung beruhen, wurde ein anderes im Cytoplasma vorkommendes Enzym, die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase zum Vergleich herangezogen. Dieses Enzym ist wesentlich stabiler als Tryptophanpyrrolase, bei 37°C werden in 10 Stunden knapp 50 % inaktiviert (Abb.13). Eine Anreicherung dieses Enzyms erfolgt weder durch Prednisolon-Behandlung noch durch Tryptophan und die Stabilität ist bei beiden Arten der Vorbehandlung gleich.

b) Einfluß antibakterieller Stoffe auf die Inaktivierung.

Bei den längeren Inkubationszeiten hatten sich in den Ansätzen reichlich Mikroorganismen vermehrt. Die Einschleppung von Keimen bei der Gewinnung des Cytoplasmas liess sich jedoch nicht vermeiden, so daß versucht werden mußte, wenigstens ihre Vermehrung zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurden den Ansätzen Desinfektionsmittel oder Antibiotika zugegeben oder der konservierende Effekt hoher Salz- oder Zuckerkonzentrationen ausgenutzt. Die an der Tryptophanpyrrolase erzielten Ergebnisse dieser Erprobungen sind in der nächsten Abbildung dargestellt (Abb.14). Das Enzym

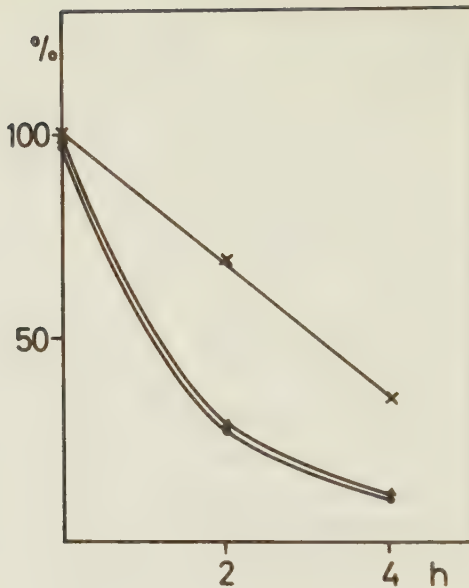


Abb. 12 : Vorbehandlung der Tiere wie in Abb. 1 a

Stabilität von Tryptophanpyrrolase im partikelfreien Cytoplasma bei 37°C unter Zusatz von Stoffen, die das Enzym in vivo anreichern.

1. ohne Zusätze

● — ●

2. $1,5 \times 10^{-4}$ mol/l bis $1,5 \times 10^{-6}$ mol/l

▲ — ▲

Prednisolon-21-hemisuccinat

3. 3×10^{-3} mol/l L-Tryptophan.

× — ×

Enzymaktivität gemessen in % der Ausgangsaktivität.

stammte aus einer Leber, in der es durch vorherige Applikation von Tryptophan angereichert worden war. Der Versuch mit Saccharose wurde auch mit einer durch Prednisolon angereicherten Enzympräparation durchgeführt. Dabei ergab sich zwischen beiden Enzympräparaten kein Unterschied. Gemessen

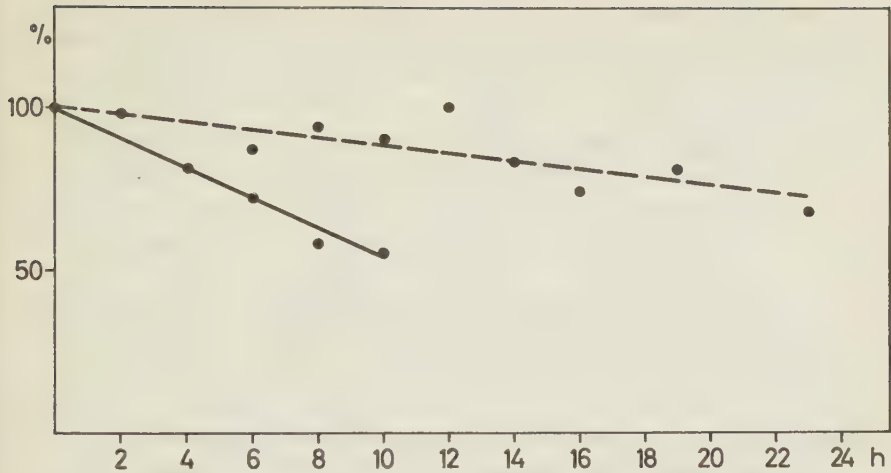


Abb. 13 : Stabilität von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
im partikelfreien Cytoplasma

bei 37°C ● - - - - - ●
und bei 27°C ● - - - - - ●

Enzymaktivität gemessen in % der Ausgangsaktivität

100 % = 250 μ mol/g/h

wurden "Apo- und Holoaktivität", sowie die "Gesamtaktivität" der Tryptophanpyrrolase. Eine Verzögerung der Inaktivierung ist allenfalls durch die 50 % Saccharose eingetreten.

10 % NaCl vermindert die Enzymaktivität und beschleunigt den Abfall, ebenso die Kombination von Nipagin und Nipasol, zweier *p*-Hydroxybenzoesäureester, die vor allem das Wachstum von Hefen und Pilzen unterdrücken. Diese Resultate zeigen eindeutig, daß die Tätigkeit von Mikroorganismen für die beobachtete Abnahme der Tryptophanpyrrolase keine Bedeutung hat.

In allen Versuchen verliefen die Inaktivierungen der "Apo- und Holoaktivitäten" parallel zur Inaktivierung der "Gesamtaktivitäten". Das bedeutet, daß die Konzentration der

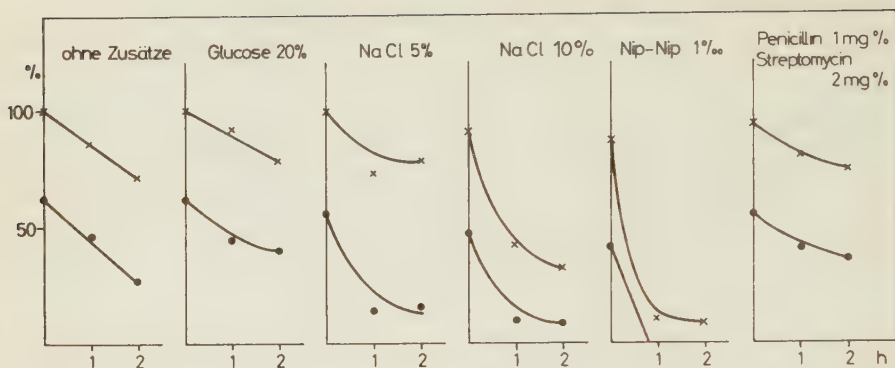


Abb. 14 : Stabilität von Tryptophanpyrrolase im partikelfreien Cytoplasma bei 37°C unter verschiedenen, das Wachstum von Mikroorganismen hemmenden Bedingungen

Vorbehandlung der Tiere wie bei Abb. 1 b

Apo- und Holoaktivität ● ————— ●
Gesamtaktivität X ————— X

Enzymaktivität in % der Ausgangsaktivität

aktivierbaren Vorstufe der Tryptophanpyrrolase nicht verändert wurde, oder daß die Inaktivierung am Apo- und Holoenzym stattfand. Demnach wird entweder das im Cytoplasma vorhandene Apoenzym oder das präformierte Holoenzym inaktiviert, während die Vorstufe, die erst während einstündiger Inkubation mit Substrat, Coenzym und Ascorbinsäure zum aktiven Enzym umgewandelt wird, stabil ist.

Bei der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, deren Aktivität in vitro viel langsamer abnimmt, so daß längere Inkubationszeiten erforderlich sind, könnten sich Mikroorganismen in weit stärkerem Maße störend bemerkbar machen. Tatsächlich trat die Aktivitätsminderung in den hypertonen Lösungen erheblich langsamer ein. 50 % Saccharose, 5 % und 10 % NaCl oder 6,5 % und 13 % KCl hatten verzögernde Effekte

gleichen Ausmaßes. Dagegen wirkten sich 20 % Glucose, 0,1 % Merthiolat, 1 % Nipagin-Nipazol[®] und die Kombination von 1 mg % Penicillin mit 2 mg % Streptomycin nicht auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung aus und verhinderten allerdings auch nicht merkbar das Keimwachstum. Somit muß bei der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase damit gerechnet werden, daß die Inaktivierung zumindest partiell durch Mikroorganismen bedingt ist (Abb.15).

c) Bedeutung von Metallionen für die Inaktivierung.

Der Einfluß von Metallionen auf die Inaktivierung war bei den beiden untersuchten Enzymen sehr verschieden. Um Ca- und Mg-Ionen verwenden zu können, wurde die sonst benutzte Phosphatpufferlösung durch eine Warmblüter-Ringer-Lösung ohne Phosphat ersetzt, die 5×10^{-4} mol/l Ca^{++} und 2×10^{-3} mol/l Mg^{++} enthielt. An der Tryptophanpyrrolase ergab sich dadurch kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Inaktivierung. Dagegen fiel die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase ganz erheblich schneller ab. Die Steilheiten der Kurven, die in Abbildung 16 eingezeichnet sind, unterscheiden sich um den Faktor 8 - 9. Der Effekt war teilweise aufzuheben, wenn der Ringerlösung das Chelatbildende Na-Äthylendiamin-tetraacetat zugesetzt wurde. Die Wirkung dieses Komplexbildners beruht wahrscheinlich nicht auf der Entionisierung eines Schwermetalles, denn Cystein in der Konzentration von $1,6 \times 10^{-3}$ mol/l war unwirksam.

d) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Inaktivierung.

Da bei der Inaktivierung der beiden Enzyme fermentative Reaktionen beteiligt sein können, wurde geprüft, ob der pH-Wert des Mediums einen Einfluß auf die Umsetzungsgeschwindigkeit ausübt. In Abbildung 17 ist die Abnahme der Aktivitäten von Tryptophanpyrrolase und Glucose-6-phosphat-

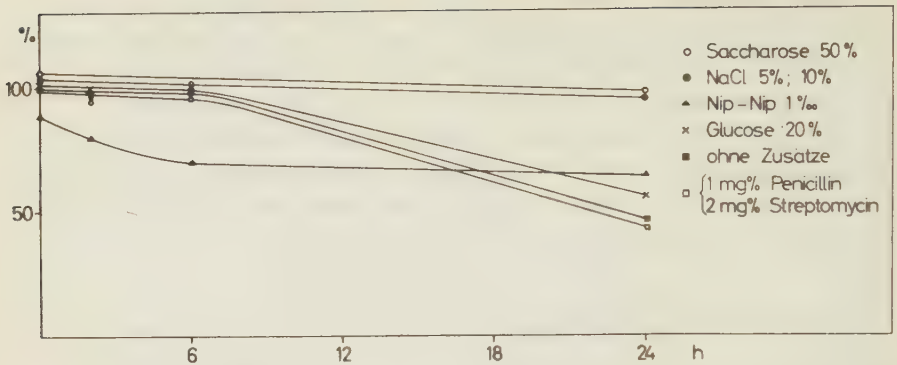


Abb. 15 : Stabilität von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase im partikelfreien Cytoplasma bei 37°C unter verschiedenen Bedingungen, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen.

Enzymaktivität gemessen in % der Ausgangsaktivität.

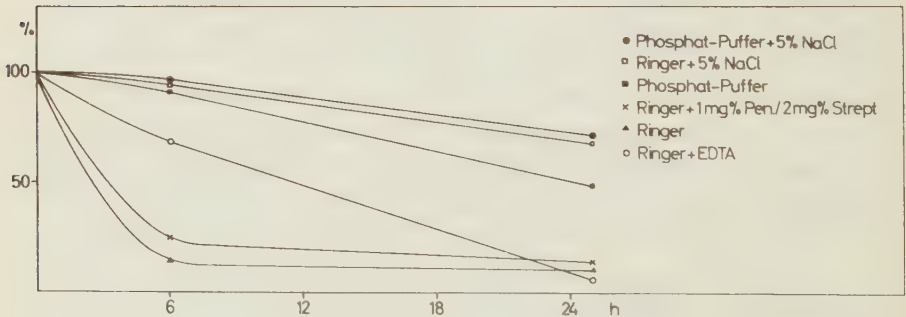


Abb. 16 : Stabilität von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase im partikelfreien Cytoplasma bei 37°C unter dem Einfluß von Erdalkali-Ionen-enthaltender Nährlösung und von EDTA.

Enzymaktivität gemessen in % der Ausgangsaktivität.

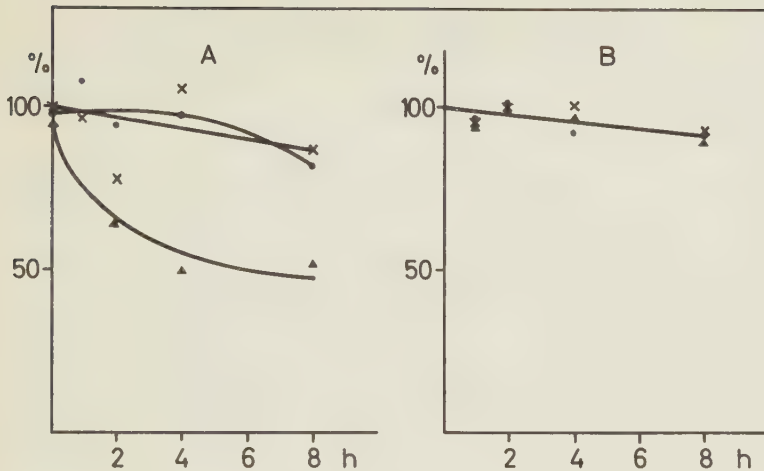


Abb. 17 : Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration bei 27°C auf die Inaktivierung von
A. Tryptophanpyrrolase
B. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase

pH 6 ▲ ——— ▲
pH 7 ● ——— ●
pH 8 × ——— ×

Enzym aus Lebern von Ratten, die 5 Stunden vorher 10 mg Prednisolon /kg erhalten hatten.

Enzymaktivität gemessen in % der Ausgangsaktivität.

dehydrogenase bei den pH-Werten 6, 7 u. 8 dargestellt. Während sich bei der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase kein Einfluß des pH-Wertes bemerkbar machte, ging die Verminderung der Tryptophanpyrrolase-Aktivität bei pH 6 wesentlich schneller vor sich als bei pH 7 und 8. Jedoch nimmt die Aktivität nicht weiter ab, wenn 50 % des Enzyms

unwirksam geworden sind. Das weist darauf hin, daß nur ein bestimmter Anteil der "Gesamtaktivität" inaktiviert wird. Um welche Fraktion es sich dabei handelt, ist nicht zu entscheiden, da in diesem Versuch die "Apo- und Holoaktivitäten" nicht ermittelt wurden.

e) Einfluß eines Proteinase-Hemmstoffes auf die Inaktivierung.

Um weitere Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, ob die Inaktivierung der Enzyme im partikelfreien Cytoplasma durch Fermente erfolgt, erschien es angebracht, einen Proteinase-Hemmstoff einwirken zu lassen. Ein solcher Hemmstoff wird unter dem Warenzeichen Trasylol[®] von den Farbwerken Bayer verkauft. Die Wirksamkeit der Substanz ist in Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KIE) ausgedrückt und als therapeutische Dosis für den Menschen werden 25 000 KIE empfohlen. In Anlehnung an diese Dosierung wurden die Konzentrationen 1 KIE/ml und 10 KIE/ml für diese Untersuchungen in vitro ausgewählt. In keiner der beiden Dosierungen und bei keinem von beiden Fermenten stellte sich eine Hemmung der inaktivierenden Prozesse heraus (Abb.18).

f) Einfluß von Zellpartikeln auf die Inaktivierung im partikelfreien Cytoplasma.

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden durchgeführt, um festzustellen, welche anderen Zellbestandteile an der Inaktivierung beteiligt sind. In der üblichen Weise erfolgte die Präparation von Zellkernen, Mitochondrien und Mikrosomen aus Lebergewebe mit Hilfe der Ultrazentrifuge. Für die Dosierung der einzelnen Zellorganellen erschien die Angabe in Äquivalenten adäquat und ausreichend genau. Von besonderem Interesse waren die in der Mitochondrienfraktion enthaltenen Lysosomen, die vorwiegend Fermente enthalten, die Abbaureaktionen katalysieren. Sie zeichnen sich insbesondere durch ihren Reichtum an hydrolytischen Enzymen

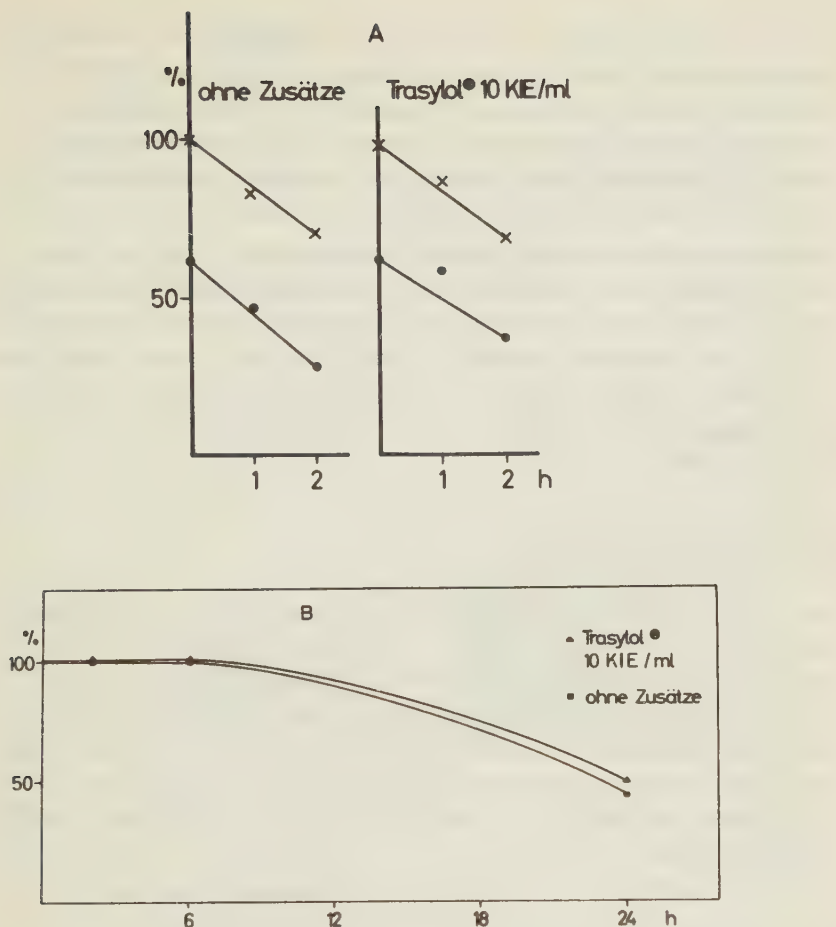


Abb. 18 : Stabilität von A. Tryptophanpyrrolase
Gesamtenzym x—x Apo- und Holoenzym ●—●

B. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase

im partikelfreien Cytoplasma bei 37°C unter Zusatz von Proteinase-Hemmstoff Trasylol[®].

Enzymaktivität in % des Ausgangswertes.

Enzym aus Lebern von Tieren, denen 5 Stunden vorher 10 mg Prednisolon /kg Körpergewicht appliziert worden war.

aus. Wie schon vorher beschrieben, können die Mikrosomen und Mitochondrien unter bestimmten Voraussetzungen die Tryptophanpyrrolase aktivieren, vor allem durch ihren Gehalt an Eisenporphyrin-Verbindungen, die als Cofaktor fungieren. Diese Aktivierung tritt jedoch nur bei Anwesenheit von Tryptophan ein und bleibt aus, wenn das Substrat fehlt.

Zunächst sollte durch größtmögliche Schonung der Partikelmembranen bei der Aufarbeitung eine Freisetzung von Enzyme verhindert werden, damit keine unspezifische und allgemeine Proteolyse eintritt. Deshalb wurde auch nach einem Vorschlag von Sawant, Shibko, Kumta und Tappel zur Stabilisierung der Lysosomenmembran 7×10^{-1} mol/l Saccharose und 2×10^{-3} mol/l EDTA zugesetzt (37).

Einfluß von Zellkernen :

Der Zusatz von 1 - 2 Äquivalenten von Zellkernen bewirkte bei 37°C eine Beschleunigung der Inaktivierung der Tryptophanpyrrolase und der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Abb.19). Das Ausmaß des Effektes zwischen einem und zwei Äquivalenten war nicht zu unterscheiden. Die Kerne aus Lebern von prednisolon- oder tryptophan-behandelten oder unbehandelten Ratten waren ebenfalls gleich wirksam. Dreimaliges Einfrieren und Auftauen, sowie Ultraschallbehandlung, um die an die Kerne gebundenen Enzyme freizusetzen, veränderten die Wirkung nicht.

Einfluß von Mitochondrien :

Der Zusatz von 1 - 2 Äquivalenten Mitochondrien hatte auf die Tryptophanpyrrolase etwa den gleichen Effekt wie die Kerne. Die Inaktivierung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase dagegen war weniger beschleunigt durch die Kerne. Veränderung der Konzentration, unterschiedliche Herkunft und unterschiedliche Behandlung, entsprechend den Versuchen mit den Kernen, änderten auch an der Wirkung der Mitochondrien nichts (Abb.19).

Einfluß von Mikrosomen :

1 - 2 Äquivalente Mikrosomen als Zusatz während der Inkubation beschleunigten die Inaktivierung der Tryptophanpyrrolase im gleichen Ausmaß wie die Kerne und Mitochondrien. Auf die Inaktivierung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase übten die Mitochondrien etwa den gleichen beschleunigenden Effekt aus wie die Kerne. Der Zusatz der Mikrosomen wurde ebenso variiert wie in den vorhergehenden Versuchen, wodurch die Wirkung der Partikel ebenfalls unverändert blieb (Abb. 19).

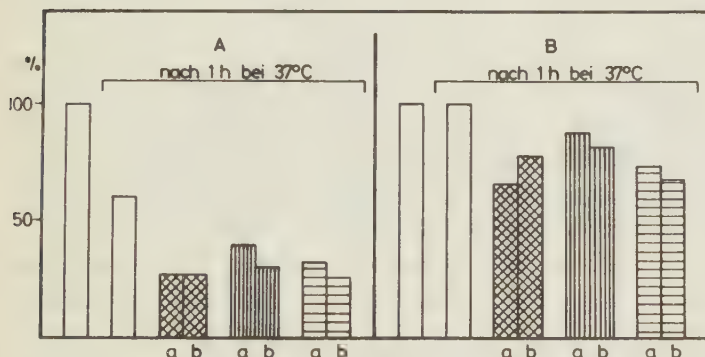


Abb. 19 : Vorbehandlung der Tiere wie in Abb. 1 a
Stabilität von :

A. Tryptophanpyrrolase

B. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase bei 37°C

1. im partikelfreien Cytoplasma
2. unter Zusatz von 2 Äquivalenten Zellkernen
3. unter Zusatz von 2 Äquivalenten Mitochondrien
4. unter Zusatz von 2 Äquivalenten Mikrosomen



a) Partikel unbehandelter Tiere

b) Partikel von Tieren, die 10 mg Prednisolon /kg
Körpergewicht 5 Stunden vorher erhalten hatten.

Enzymaktivität ausgedrückt in % der Anfangsaktivität.

Nach entsprechend längerer Inkubation bei 27°C hatten die Mikrosomen die gleiche Wirkung wie bei 37°C. Der Effekt zeigte sich im gleichen Ausmaß im partikelfreien Cytoplasma, das von Lebern prednisolonbehandelter Tiere stammte wie in dem aus Lebern tryptophanbehandelter Ratten (Abb.20).

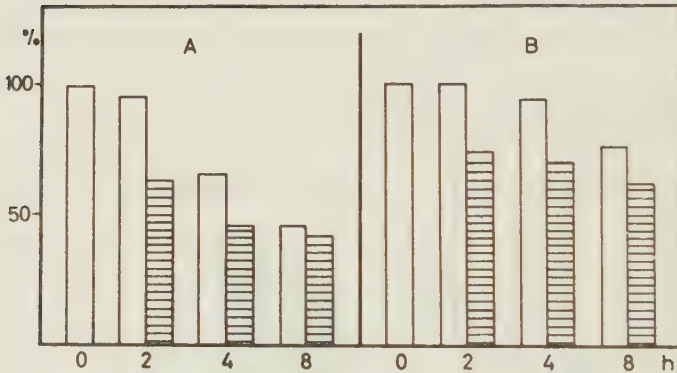


Abb. 20 : Stabilität von Tryptophanpyrrolase im partikelfreien Cytoplasma

unter Zusatz von 2 Äquivalenten Mikrosomen
Inkubation bis zu 8 Stunden bei 27°C.

A. Vorbehandlung der Tiere mit 10 mg Prednisolon /kg Körpergewicht

B. Vorbehandlung der Tiere mit 1 g DL-Tryptophan /kg Körpergewicht

Enzymaktivität ausgedrückt in % der Anfangsaktivität.

Besprechung der Ergebnisse :

Die Untersuchungen gliedern sich in zwei Abschnitte. Der erste diente vornehmlich der Ermittlung optimaler Bedingungen zur Aktivierung der Tryptophanpyrrolase oder etwaiger Vorstufen dieses Enzyms. Dafür waren zwei Verfahren bereits vorgeschlagen, das eine von Knox, Piras und Tokuyama und ein anderes von Greengard, Mendelsohn und Acs.

Zunächst war festzustellen, ob beide Verfahren zu dem gleichen Ziel führen, insbesondere, ob bei beiden Verfahren die gleichen Vorstufen in aktives Enzym umgewandelt werden. Diese Frage läßt sich aufgrund der durchgeführten Experimente beantworten. Neben dem im Zellsaft vorliegenden fertig gebildeten Holoenzym befindet sich dort auch Apoenzym, das allein durch die Zugabe von Stoffen, die als Coenzym wirken, also Hämatin oder MetHb, zu funktionierendem Holoenzym ergänzt werden kann, wenn die Präparation für 30 - 60 Minuten bei 37°C mit Coenzym, Substrat und Ascorbinsäure zusammengebracht wird. Die Ascorbinsäure kann auch durch Zellorganellen, Mitochondrien oder Mikrosomen, ersetzt werden, denn diese enthalten offenbar ebenfalls reduzierende Substanzen (47).

Zwischen der Wirksamkeit von Mikrosomen und Mitochondrien ist kein Unterschied festzustellen. Das Verfahren von Greengard, bei dem anstelle von Ascorbinsäure der Zusatz von Mitochondrien oder Mikrosomen empfohlen wird, bietet also keine Vorteile. Die von Knox für optimale Wirksamkeit angegebene Konzentration von MetHb erwies sich auch in den eigenen Versuchen als zutreffend. Dagegen hat Knox einen wesentlich höheren Überschuß an Ascorbinsäure verwendet. Er empfiehlt 10^{-2} mol/l, während aus den eigenen Experimenten die Konzentration von 10^{-3} mol/l als optimal hervorging.

Selbstverständlich wäre es für die Deutung der nachfolgenden Experimente wichtig gewesen, zu ergründen, in welcher Form die Enzymvorstufe im Zellsaft vorliegt, die sich durch

eine längere Inkubation mit Coenzym, Substrat und einem Reduktionsmittel in aktives Enzym umwandeln läßt. Hier sind bisher leider nur Spekulationen möglich. Anknüpfungspunkte bieten vielleicht die Überlegungen über die allosterische Transition von Enzymproteinen durch niedermolekulare Stoffe (8, 31). Darunter stellt man sich eine Veränderung der räumlichen Anordnung des Enzymmoleküls vor, die durch die Anlagerung von niedermolekulären Stoffen, sogenannten Effektoren, zustande kommt. Dadurch würde auch die Position der reaktionsfähigen und der an der enzymatischen Funktion beteiligten Gruppen etwas verschoben werden und das könnte eine Änderung der Enzymaktivität zur Folge haben. Als einer der möglichen Effektoren muß das Substratmolekül in Betracht gezogen werden, das diese Wirkung allerdings nur ausüben kann, wenn es an Gruppen im Enzymmolekül angelagert wird, die nicht Träger der enzymatischen Reaktion sind. Eine solche Anlagerung ist bei der Tryptophanpyrrolase schon vor längerer Zeit in Erwägung gezogen worden. Knox hat die Zusammenlagerung von Apoenzym mit Coenzym und Substrat als ternären Komplex bezeichnet, der stabiler und enzymatisch wirksamer ist als das Holoenzym. Das würde somit bedeuten, daß während der Inkubation mit Coenzym, Substrat und einem Reduktionsmittel keine zusätzlichen Eiweißmoleküle in eine enzymatisch aktive Form überführt werden, sondern in den vorhandenen Enzymmolekülen durch räumliche Verschiebungen, die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Gruppen in eine Position gelangen, die ihre Reaktionsfähigkeit begünstigt. Auf diese Weise könnte erklärt werden, weshalb bei der Inaktivierung der Tryptophanpyrrolase der durch Inkubation mit Substrat aktivierbare Anteil nicht absinkt. Man müßte allerdings folgern, daß die allosterische Transition nur an dem bereits vorhandenen Holoenzym stattfinden kann, nicht aber an dem Apoenzym, das dem Angriff inaktivierender Prozesse stärker ausgesetzt sein könnte, denn das Substrat übt dagegen eindeutig einen schützenden Effekt aus.

Der zweite Abschnitt der Untersuchungen galt der Ferment-inaktivierung in vitro. Dabei erwies sich die Tryptophan-pyrrolase als wesentlich labiler als Glucose-6-phosphat-dehydrogenase. Folglich kann diese Inaktivierung nicht durch eine unspezifische Eiweißdenaturierung bedingt sein. Dem widerspricht auch die Beschleunigung der Aktivitätsabnahme, die durch den Zusatz von Zellorganellen bei beiden Enzymen erreicht werden kann. In der Stärke der Wirkung unterschieden sich Kerne, Mitochondrien und Mikrosomen bei der Inaktivierung der Tryptophanpyrrolase nicht nachweisbar voneinander. Auch waren die Zellorganellen von Tieren, bei denen durch Tryptophan- oder Prednisolon-Behandlung eine Vermehrung der Tryptophanpyrrolase herbeigeführt worden war, gleich wirksam und nicht weniger effektiv als die unbehandelten Tiere.

Die Inaktivierung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase ließ sich durch Zugabe von Zellkernen oder von Mikrosomen beschleunigen, nicht dagegen durch Mitochondrien. Mikrosomen waren wirksamer als Kerne. Da die Inaktivierung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase im partikelfreien Cytoplasma außerordentlich langsam verläuft, ist anzunehmen, daß die für die Inaktivierung dieses Fermentes verantwortlichen Enzyme sich vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum befinden. Ob die Kerne selbst ebenfalls solche Enzyme enthalten, wird sich auf Grund der vorliegenden Resultate schwer entscheiden lassen, weil nicht ausreichend sichergestellt ist, daß bei der Gewinnung der Kerne die anhaftenden Teile der endoplasmatischen Membranen abgetrennt worden sind.

Auf der anderen Seite geben die an der Tryptophanpyrrolase gewonnenen Resultate keine Hinweise auf die Lokalisation der an der Inaktivierung beteiligten Enzyme. Daraus wird man ableiten müssen, daß es sich nicht um ein Ferment handelt, das speziell für den Abbau der Tryptophanpyrrolase bestimmt ist, sondern um ein Ferment, oder vielleicht auch mehrere Fermente, die allgemein den Abbau von Eiweißen in der Zelle vollziehen. Durch welche chemische Reaktion das geschieht, ist nicht geklärt. Zuerst könnte an die Tätigkeit von Proteinasen gedacht

werden, also an Fermente, die Peptidbindungen im Verband der Eiweißmoleküle spalten. Deshalb ist geprüft worden, ob der im Trasylol enthaltene Proteinasehemmstoff die Inaktivierungen unterdrückt. In den angewendeten Konzentrationen war dies nicht der Fall. Jedoch kann mit Recht eingewendet werden, daß die Konzentration vielleicht zu gering war.

Ein Hinweis auf die enzymatische Inaktivierung gibt der stark beschleunigende Effekt von Ca-Ionen und Mg-Ionen bei der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, die in Ringer-Lösung, welche diese Ionen enthält, ihre Aktivität schon innerhalb von 6 Stunden nahezu vollständig einbüßte. Durch Zusatz von EDTA, das Metalle bindet, ließ sich der Effekt abschwächen, aber nicht durch Cystein, das nur Schwermetalle binden kann. Diese Wirkung von Ca- und Mg-Ionen trat bei der Inaktivierung der Tryptophanpyrrolase nicht auf.

Umgekehrt verhielten sich die Inaktivierungsvorgänge an den beiden Enzymen gegenüber Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase wurde bei pH-Werten zwischen 6 bis 8 mit unveränderter Geschwindigkeit inaktiviert. - Die Verminderung der Tryptophanpyrrolase-Aktivität erfolgte dagegen bei pH 6 erheblich schneller als bei den pH-Werten 7 und 8.

Der von anderen Autoren schon früher beschriebene stabilisierende Einfluß von Tryptophan auf die Tryptophanpyrrolase hat sich auf verschiedene Weise bestätigen lassen. Erstens ist das Enzym in vitro stabiler, wenn das Tier, von dem die Leber stammte, vorher eine hohe Dosis Tryptophan erhalten hatte. Zweitens vermindert der Zusatz von Tryptophan zu der Pufferlösung, in der die Leber homogenisiert wird, die Inaktivierung in vitro. Und drittens ließ sich auch eine Verlangsamung der Inaktivierung durch späteren Zusatz von Tryptophan zum Inkubationsmedium nachweisen.

Für den Abbau der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase war Tryptophan völlig indifferent.

Weder die Vorbehandlung der Tiere mit Glucocorticoiden, noch der Zusatz von Prednisolon in vitro, hatte irgendeinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung eines der beiden Enzyme.

Bei derartigen Versuchen, bei denen nährstoffhaltige Lösungen in vitro längere Zeit bei Körpertemperatur aufbewahrt werden, muß stets die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß sich Mikroorganismen in den Ansätzen vermehren und durch ihre Tätigkeit die Resultate der Untersuchungen beeinträchtigen. - Die Experimente mit der Tryptophanpyrrolase dauerten im allgemeinen nur 1 bis 2 Stunden, so daß Mikroorganismen noch keine wesentliche Rolle spielen können. Tatsächlich war durch keine der Maßnahmen, die zur Unterdrückung der Keimvermehrung ausprobiert wurden, eine Verminderung der Inaktivierung zu erreichen. Die Tryptophanpyrrolase selbst war aber empfindlich gegen hohe Salzkonzentrationen. In 5 %iger NaCl-Lösung funktionierte sie noch einwandfrei, bei 10 %iger Lösung dagegen, war sie bereits deutlich weniger aktiv und verlor ihre Aktivität auch in kürzerer Zeit, war also labiler.

Auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase andererseits übte eine hohe NaCl-Konzentration keinen Einfluß aus. Selbst in 30 %iger NaCl-Lösung lief die enzymatische Reaktion völlig unverändert ab. An diesem Enzym zeigte sich bei Inkubationsversuchen, die länger als 6 Stunden dauerten, daß Maßnahmen, die das Keimwachstum unterdrückten, gleichzeitig die Inaktivierung hemmen. Ein wesentlicher Anteil der Inaktivierung muß somit der Tätigkeit bakterieller Enzyme zugeschrieben werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß die hohen Konzentrationen von Salzen oder Zucker, die das Wachstum der Bakterien unterdrücken, gleichzeitig die abbauenden Enzyme schädigen.

Aufgrund der Experimente erscheinen folgende Schlußfolgerungen berechtigt: Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und Tryptophanpyrrolase werden in der Zelle von verschiedenen

Fermenten inaktiviert. Das die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase abbauende Ferment ist vorwiegend in den Strukturen des endoplasmatischen Retikulums enthalten und stark abhängig von der Ca- oder Mg-Ionenkonzentration. - Die Tryptophanpyrrolase wird von einem Ferment inaktiviert, das in allen Zellkompartimenten vorkommt. Dessen Aktivität ist im schwach sauren Milieu größer als im neutralen und schwach alkalischen.

Tryptophanpyrrolase wird bei erhöhter Tryptophan-Konzentration langsamer inaktiviert. Dies kommt als Ursache für die in vivo durch Tryptophan-Applikation hervorgerufene Anreicherung von Tryptophanpyrrolase in Frage.

Glucocorticoide beeinflussen in vitro weder die Stabilität der Tryptophanpyrrolase noch die der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase. Folglich kann dieser Mechanismus bei der durch Glucocorticoide hervorgerufenen Vermehrung keine Rolle spielen. Diese Deutungen stehen im Einklang mit denen von Greengard und Feigelson, sowie Schimke, Sweeney und Berlin (18, 12, 38, 39, 40, 41).

Zusammenfassung :

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit Untersuchungen zur Aktivierung der Tryptophanpyrrolase im partikelfreien Zellsaft der Rattenleber. - Während einer Inkubation von 30 - 60 Minuten bei 37°C steigt die Aktivität auf das 2-3fache an, wenn das Medium Substrat, Coenzym und als Reduktionsmittel Ascorbinsäure enthält. Durch Zusatz von Mikrosomen oder Mitochondrien, Coenzym und Substrat läßt sich der gleiche, aber kein darüber hinausgehender Effekt erzielen. - Methämoglobin ist als Coenzym besser wirksam als Hämatin. Die Wirksamkeit von Methämoglobin wird durch Denaturieren des Globins vermindert.

Im zweiten Teil der Arbeit wird berichtet über Versuche zur Inaktivierung von Tryptophanpyrrolase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, die sich gelöst in der Cytoplasmafraktion befinden, durch verschiedene Zellbestandteile.

Die Inaktivierung ist stark von der Temperatur abhängig. Sie erfolgt bei 37°C wesentlich schneller als bei 27°C. Tryptophanpyrrolase verliert in 2-3 Stunden mehr als 90 % seiner Aktivität.

Glucose-6-phosphat-dehydrogenase wird viel langsamer abgebaut. Nach 6 Stunden sind noch 90 % der Aktivität vorhanden. - Bei längerer Inkubation werden die Enzyme durch Mikroorganismen stark beeinträchtigt. Deshalb wurden verschiedene Maßnahmen zur Unterdrückung des Bakterienwachstums ausprobiert. Am besten wirkten hohe Konzentrationen von Neutralsalzen oder Zucker, die keinen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase ausübten. Tryptophanpyrrolase dagegen wurde durch NaCl in Konzentrationen über 5 % partiell inaktiviert.

Änderung der Wasserstoffionenkonzentration im Bereich zwischen pH-Werten von 6-8 hatte keinen Einfluß auf die Inaktivierung von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase. Die Inak-

tivierung von Tryptophanpyrrolase verlief bei pH 6 erheblich schneller als bei pH 7 und 8.

Ca- und Mg-Ionen beschleunigen stark die Inaktivierung von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, aber nicht die von Tryptophanpyrrolase.

Durch Zusatz von Tryptophan zum Medium wird die Inaktivierung von Tryptophanpyrrolase verzögert. Darauf beruht wahrscheinlich die am lebenden Tier auftretende Anreicherung dieses Enzyms nach der Applikation hoher Dosen von Tryptophan.

Außerdem wurde der Einfluß von Zellkernen, Mitochondrien und Mikrosomen auf die Inaktivierung geprüft. Der Abbau von Glucose-6-phosphat-dehydrogenase wird durch Zellkerne, stärker aber durch Mikrosomen beschleunigt. - Alle 3 Zellorganellen fördern die Inaktivierung von Tryptophanpyrrolase. Quantitative Unterschiede ließen sich nicht feststellen. Partikel, die aus Lebern von Tieren stammten, bei denen durch Behandlung mit Tryptophan oder Prednisolon eine Anreicherung der Tryptophanpyrrolase erzeugt worden war, hatten keine andere Wirksamkeit als die unbehandelten Tiere.

Literaturverzeichnis :

1. Allen, M.J., Boyland, E., Dukes, C.E., Horning, E.S. und Watson, J.G.: Brit. J. Cancer 11, 212 (1957)
2. Brown, R.R., Price, J.M. und Wear, J.B.:
Am. Assoc. Cancer Res. 2, 7 (1955)
3. Bryan, G.T., Brown, R.R. und Price, J.M.:
Cancer Res. 24, 596 (1964)
4. Bryan, G.T., Brown, R.R. und Price, J.M.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 108, 924 (1963)
5. Civen, M. und Knox, W.E.: Fed. Proc. 16, 165 (1957)
6. Civen, M. und Knox, W.E.: J. biol. Chem. 234, 1787 (1959)
7. Civen, M. und Knox, W.E.: J. biol. Chem. 235, 1716 (1960)
8. Cohen, G.M.: Ann. Rev. Microbiol. 19, 105 (1965)
9. Dubnoff, J.W. und Dimick, M.: Biochim. Biophys. Acta 31, 541
(1959)
10. Feigelson, P. und Greengard, O.: J. biol. Chem. 236, 153 (1961)
11. Feigelson, P., Dashman, T. und Margolis, F.:
Arch. Biochem. Biophys. 85, 478 (1959)
12. Feigelson, P., Feigelson, M. und Greengard, O.:
Prog. Horm. Res. 18, 491 (1962)
13. Feigelson, P. u. Greengard, O.: J. biol. Chem. 237, 3714 (1962)
14. Goldstein, L., Stella, E.J. und Knox, W.E.:
J. biol. Chem. 237, 1723 (1962)
15. Greengard, O. und Feigelson, P.: Nature 190, 446 (1961)
16. Greengard, O. und Feigelson, P.: J. biol. Chem. 236, 158 (1961)
17. Greengard, O. und Feigelson, P.: Biochem. J. 84, 111 (1962)
18. Greengard, O.: Advances in enzyme regulation, vol 1, p. 61
(ld. G. Weber) London: Pergamon Press 1963

19. Greengard, O., Smith, M. und Acs, G.:
J. biol. Chem. 238, 1548 (1963)
20. Greengard, O., Mendelsohn, N. und Acs, G.:
J. biol. Chem. 241, 297 (1966)
21. Kewitz, H. und Wagner, H.: Arzneimittel-Forsch. 15, 1 (1965)
22. Knox, W.E., Piras, M. und Tokuyama, K.:
J. biol. Chem. 241, 297 (1966)
23. Knox, W.E.: Brit. J. Exp. Path. 32, 462 (1951)
24. Knox, W.E. und Mehler, A.J.: J. biol. Chem. 187, 419 (1950)
25. Knox, W.E. und Ogata, M.: J. biol. Chem. 240, 2216 (1965)
26. Knox, W.E., Piras, M. und Tokuyama, K.:
Fed. Proc. 24, 474 (1965)
27. Knox, W.E. und Piras, M.: J. biol. Chem. 241, 764 (1966)
28. Knox, W.E. und Mehler, A.H.: Science 113, 237 (1951)
29. Kornberg, A. und Horecker, B.L.:
Methods in Enzymology I, Academic Press N.Y. (1955)
30. Löhr, G.W. und Waller, H.D.: Klin. Wschr. 37, 833 (1959)
31. Monod, J., Wyman, J. und Changeux, J.-P.:
J. mol. Biol. 12, 88 (1965)
32. Nemeth, A.M. und de la Haba, G.:
J. biol. Chem. 237, 1190 (1962)
33. Nemeth, A.M.: J. biol. Chem. 237, 3703 (1962)
34. Pamukcu, A.M., Brown, R.R. und Price, J.M.:
Cancer Res. 19, 321 (1959)
35. Rosen, F. und Milholland: J. biol. Chem. 40, 739 (1962)
36. Sankoff, J. und Sourkes, T.L.: Can. J. Biochem. Physiol.
40, 739 (1962)
37. Sawant, P.L., Shibko, S., Kumta U.S. und Tappel, A.L.:
Biochim. Biophys. Acta 85, 82 (1964)

38. Schimke, R.T., Berlin, C. und Sweeney, E.W.:
Fed. Proc. 23, 481 (1964)
39. Schimke, R.T., Berlin, C. und Sweeney, E.W.:
Biochem. biophys. Res. Comm. 15, 214 (1964)
40. Schimke, R.T., Sweeney, E.W. und Berlin, C.:
J. biol. Chem. 240, 322 (1965)
41. Schimke, R.T., Sweeney, E.W. und Berlin, C.:
J. biol. Chem. 240, 4609 (1965)
42. Schneider, W.C.: J. biol. Chem. 176, 259 (1948)
43. Sourkes, T.L. und Townsend, E.:
Can. J. Biochem. Physiol. 33, 735 (1955)
44. Tanaka, K. und Knox, W.E.: J. biol. Chem. 234, 1162 (1959)
45. Thomson, J.F. und Mikuta, E.T.:
Endocrinology, 55, 232 (1954)
46. Tokuyama, K. und Knox, W.E.:
Biochim. Biophys. Acta 81, 201 (1964)
47. Velick, S.F. und Strittmatter, P.:
J. biol. Chem. 221, 265 (1956)
48. Warburg, O. und Christian, W.:
Biochem. Zeitschr. 242, 206 (1931)

Herrn Professor Dr. med. H. Kewitz danke
ich sehr für die Überlassung des Themas
und die großzügige Unterstützung bei der
Ausarbeitung der Dissertation.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Pleul
für seine Mithilfe bei der Durchführung
der Versuche.

Lebenslauf

Am 30. Mai 1938 wurde ich, Christian Raack, als Sohn des Bergassessors Wolfgang Raack und seiner Ehefrau Renate, geb. Huber, in Senftenberg (Provinz Brandenburg) geboren.

Vom Sommer 1945 bis Herbst 1950 besuchte ich die Volksschule in Eutin/Schleswig-Holstein, daran anschließend die Oberschule in Bad Godesberg. Vom Frühjahr 1954 ab war ich Schüler des Albertus-Magnus-Gymnasiums in Köln, an dem ich im März 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Darauf begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, das ich nach dem ersten Semester durch eine einjährige landwirtschaftliche Tätigkeit im Ausland unterbrach.

Im Herbst 1959 nahm ich das Studium in Berlin wieder auf und bestand im Herbst 1961 die tierärztliche Vorprüfung. Nach zwei Semestern klinischer Vorlesungen an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover kehrte ich zum Wintersemester 1962 nach Berlin zurück und bestand hier im Winter 1964 das tierärztliche Staatsexamen.

Die tierärztliche Praktikantenzeit leistete ich in einer Großtier-Praxis in Schleswig-Holstein ab. Am 15. Juli 1965 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt. Danach war ich ein dreiviertel Jahr in der gleichen Praxis als Assistent tätig.

Seit dem 1. Mai 1966 bin ich Doktorand am Institut für Veterinär-Pharmakologie und Toxikologie der Freien Universität Berlin.

